

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM ANTIMUTAGENNÍCH VLASTNOSTÍ VYBRANÝCH DRUHŮ
MEDŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ANDREA LICHNOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM ANTIMUTAGENNÍCH VLASTNOSTÍ VYBRANÝCH DRUHŮ MEDŮ

STUDY OF ANTIMUTAGENIC PROPERTIES OF SELECTED KINDS OF HONEY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

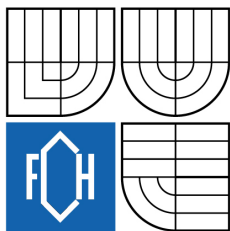
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ANDREA LICHNOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0235/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Andrea Lichnová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti diplomové práce:		

Název diplomové práce:

Studium antimutagenních vlastností vybraných druhů medů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - med, účinné látky, stanovení antimutagenity
2. Optimalizace vybraných metod stanovení antimutagenní aktivity medu
3. Srovnávací studie - stanovení antimutagenity vybraných druhů medu; srovnání s antioxidační aktivitou a vybranými obsahovými látkami
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Andrea Lichnová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce je zaměřena na studium antimutagenních účinků vybraných druhů medů a propolisu. V medech byly analyzovány látky podílející se na antimutagenním a antioxidačním účinku. Dále byl sledován vliv dlouhodobého skladování na změny obsahu těchto aktivních látek. Antimutagenní aktivita byla testována pomocí jednobuněčného eukaryotického systému - kvasinkového kmene *Saccharomyces cerevisiae* D7. Aktivní látky byly analyzovány spektrofotometricky a pomocí RP/HPLC/UV-VIS, HPLC/PDA a on-line LC/MS.

Nejvyšší hodnoty antimutagenního účinku a současně nejvyšší stabilita hodnot byla nalezena u více druhů směsných květových medů, u řepkového medu, medu z eukalyptových a pomerančových květů a u medu medovicového. Medy získané v obchodní síti vykazovaly většinou nižší hodnoty antimutagenity než medy pořízené u včelaře. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl změřen u medu s přídavkem mateří kašičky, nejmenší u akátového medu. Nejvyšší obsah celkových flavonoidů vykazoval pohankový med a med z eukalyptových květů. V průběhu skladování dochází k významným ztrátám obsahu celkových polyfenolů (50-70 %), kdežto obsah celkových flavonoidů je velmi stabilní a v průběhu skladování se obsah téměř nemění. Medy s vysokou hodnotou antimutagenity obsahují také vyšší obsah polyfenolů, především flavonoidů a vysokou hodnotu antioxidační aktivity. V průběhu skladování došlo celkově k nepříliš významným změnám obsahu většiny aktivních látek, med tedy lze považovat za potravinu, která si zachovává po delší dobu své pozitivní nutriční vlastnosti.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antimutagenita, med, antioxidanty

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on study of antimutagenic properties in selected kinds of honey and propolis. In honey extracts compounds with antimutagenic and antioxidant effect were analysed by spectrophotometry, RP/HPLC/UV-VIS, HPLC/PDA and on-line LC/MS. Further, effect of long-term storage on active compound levels was studied. Antimutagenic activity was tested by simple eukaryotic system - yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* D7.

The highest antimutagenic effect and simultaneously the highest stability of antimutagenity values was found in several kinds of multi-floral honey, rape seed honey, honey from eucalypt and orange flowers and in honeydew honey. Samples obtained from trade network exhibited at general lower antimutagenity values when compared with samples from bee-keeper. The highest content of total phenolics was detected in honey with royal jelly, the lowest content was measured in acacia honey. The highest values of total flavonoids exhibited buckwheat and eucalypt flower honey. Total phenolic content was substantially changed during long-term storage (decrease about 50 -70 %), while total flavonoid content was stable and no significant changes during storage were observed. Honey with high antimutagenity values exhibited also higher phenolic and predominantly flavonoid content and high antioxidant activity. Because of relative stability and low changes in most of honey samples during storage it can be concluded that honey belong to foodstuffs which are able to conserve their positive nutritive properties for a long time.

KEYWORDS

Antimutagenity, honey, antioxidants

LICHNOVÁ, A. *Studium antimutagenních vlastností vybraných druhů medů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 140 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za všestrannou pomoc a trpělivost, dále Miroslavu Skutkovi za pomoc při měření experimentální části. A v neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu během celého studia.

1 OBSAH

1	OBSAH	11
2	ÚVOD	15
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	16
3.1	Včelařství	16
3.2	Historie medu	16
3.3	Nektar	17
3.3.1	Složení nektaru	17
3.4	Medovice	18
3.4.1	Složení medovice	18
3.5	Vznik medu	19
3.6	Definice medu	19
3.7	Klamání spotřebitele	22
3.7.1	Med falšovaný	23
3.7.2	Med nepravý.....	23
3.7.3	Med nesprávně označený	23
3.8	Propolis.....	23
3.9	Pyl.....	25
3.10	Fyzikální vlastnosti medu.....	26
3.10.1	Viskozita medu.....	26
3.10.2	Hustota medu.....	26
3.10.3	Hygroskopicitu medu	26
3.10.4	pH medu	27
3.10.5	Povrchové napětí	27
3.10.6	Barva	27
3.10.7	Optická rotace	27
3.11	Chemické složení medu	27
3.11.1	Obsah vody.....	27
3.11.1.1	Fermentace medu	27
3.11.2	Sacharidy v medu	28
3.11.2.1	Zastoupení a obsah jednotlivých sacharidů	28
3.11.2.2	Peroxidázová a neperoxidázová aktivita, osmotický účinek sacharidů... ..	29
3.11.2.3	Sladkost medu.....	29
3.11.3	Další látky obsažené v medu	29
3.11.3.1	Aromatické látky.....	29
3.11.3.2	Barviva.....	29
3.11.3.3	Organické kyseliny	30
3.11.3.4	Minerální látky	30
3.11.3.5	Proteiny	30
3.11.3.6	Aminokyseliny v medu	31
3.11.4	Enzymy v medu.....	31
3.11.4.1	Enzymy včelího původu	31
3.11.4.2	Enzymy pocházející z jiného sociálního hmyzu.....	32
3.11.4.3	Enzymy rostlinného původu	32

3.11.4.4	Látky hormonálního charakteru a další specifické molekuly v medu	32
3.11.5	Vitaminy v medu	32
3.12	Antioxidanty v medu	33
3.12.1	Antioxidační vitaminy a provitaminy	33
3.12.2	Vitamin C	33
3.12.3	Vitamin E	34
3.12.4	Vitamin A a karotenoidy	36
3.13	Flavonoidy	37
3.13.1	Antioxidační účinky flavonoidů	39
3.13.2	Nežádoucí látky v medu	40
3.13.2.1	Toxiny	40
3.13.2.2	Hydroxymethylfurfural	41
3.14	Mikrobiologický profil medu	41
3.15	Krystalizace medu	42
3.16	Využití medu	43
3.17	Studium antimutagenních/genotoxických vlastností	44
3.17.1	Mutagen	45
3.17.2	Mutace	45
3.17.3	Metody testování antimutagenních a genotoxických účinků	46
3.17.3.1	Testování na kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7	46
3.17.3.2	Testování na organismu <i>Euglena gracilis</i>	48
3.17.3.3	Amesův test	49
3.17.3.4	Další testy genotoxicity	50
	SOS Chromotest	50
	Cytogenetická analýza aberací chromozómů periferních lymfocytů	50
	Test na organismu <i>Drosophilla melanogaster</i>	50
	Výměna sesterských chromatid	51
	Test tvorby mikrojader	51
	DNA adukty	51
3.17.4	4-nitrochinolin-1-oxid (4-NQO)	51
3.18	Metody stanovení aktivních látek v medu	52
3.18.1	Extrakce	52
3.18.1.1	Extrakce kapalina-kapalina (LLE = liquid-liquid extraction)	52
3.18.2	Titrace	53
3.18.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity	53
3.18.3.1	Metoda ABTS	53
3.18.4	Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti	53
3.18.5	Chromatografické metody	54
3.18.5.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC	54
3.18.6	Hmotnostní spektrometrie	55
3.18.6.1	Hmotnostní spektrum	56
3.18.7	Spojení HPLC/MS	57
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	58
4.1	Použité chemikálie	58
4.1.1	Chemikálie pro kultivaci a testování antimutagenity/genotoxicity	58
4.1.2	Mikroorganismy pro testování antimutagenity/genotoxicity	58

4.1.3	Standardní chemikálie	58
4.1.4	Ostatní chemikálie	59
4.1.5	Použité přístroje a pomůcky	59
4.1.6	Materiál	60
4.2	Testování antimutagenity/genotoxicity na kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7	61
4.2.1	Kultivace kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7	61
4.2.1.1	Selektivní média	62
4.2.2	Postup testování antimutagenních účinků na kvasinkách <i>S. cerevisiae</i> D7	63
4.3	Testování povrchové mikroflóry	64
4.4	Stanovení aktivních látek v medu	64
4.4.1	Stanovení celkových polyfenolů	64
4.4.1.1	Vlastní stanovení	64
4.4.1.2	Sestavení kalibrační křivky	64
4.4.2	Stanovení celkových flavonoidů	65
4.4.2.1	Vlastní stanovení	65
4.4.2.2	Sestavení kalibrační křivky	65
4.4.3	Stanovení celkové antioxidační kapacity pomocí ABTS	65
4.4.4	Titrační stanovení kyseliny askorbové	66
4.4.5	Stanovení obsahu α - a β -karotenu, α -tokoferolu a luteinu pomocí metody HPLC	66
4.4.5.1	Extrakce a analýza	66
4.4.5.2	Sestavení kalibrační křivky	66
4.4.6	Stanovení obsahu katechinů pomocí metody HPLC	67
4.4.6.1	Extrakce a analýza	67
4.4.6.2	Sestavení kalibrační křivky	67
4.4.7	Stanovení obsahu jednotlivých flavonoidů pomocí metody HPLC	67
4.4.7.1	Extrakce a analýza	67
4.4.7.2	Sestavení kalibrační křivky	68
4.4.8	Stanovení obsahu hydroxymethylfurfuralu pomocí metody HPLC	68
4.4.8.1	Extrakce a analýza	68
4.4.9	Stanovení vybraných sacharidů	68
4.4.10	Stanovení flavonoidů a katechinů pomocí metody HPLC/MS	69
4.4.10.1	Stanovení katechinů	69
4.4.10.2	Stanovení jednotlivých flavonoidů	69
5	CÍL PRÁCE	70
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	71
6.1	Výběr biologického materiálu	71
6.2	Stanovení antimutagenních/genotoxických vlastností	72
6.3	Stanovení aktivních látek v medu	82
6.3.1	Stanovení celkových polyfenolů	82
6.3.2	Stanovení celkových flavonoidů	83
6.3.3	Stanovení celkové antioxidační kapacity pomocí ABTS	90
6.3.4	Stanovení kyseliny askorbové	94
6.3.5	Stanovení obsahu α -, β -karotenu, α -tokoferolu a luteinu	96
6.3.6	Stanovení obsahu katechinů metodou HPLC	99

6.3.7	Stanovení obsahu jednotlivých flavonoidů pomocí metody HPLC	104
6.3.8	Identifikace flavonoidů metodou on-line LC/MS	109
6.3.9	Stanovení obsahu hydroxymethylfurfuralu pomocí metody HPLC.....	119
6.3.10	Stanovení obsahu vybraných sacharidů	121
7	ZÁVĚRY.....	124
8	LITERATURA.....	127
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	130
10	SEZNAM PŘÍLOH	131
11	PŘÍLOHY.....	132

2 ÚVOD

V současné době je konzumace zdraví prospěšných potravin nejen moderní, ale z důvodu zhoršující se kvality životního prostředí a nepříliš zdravého životního stylu se pomalu stává nutností. Konzumací vhodných potravin lze s výhodou využívat přirozené zdraví prospěšné obsahové látky a bránit se tak negativním dopadům lidské činnosti. Jako nutraceutika mohou působit vitamíny, minerální látky, aminokyseliny, antioxidanty a v neposlední řadě i látky s antimutagenními a antikarcinogenními účinky.

Antimutagenní a antikarcinogenní efekt je v současné době velmi aktuální téma. Vědci na celém světě se snaží nalézt účinné látky proti zvyšujícímu se počtu nádorových onemocnění, ale také se snaží najít způsob, jak těmto nemocem předcházet. S tím úzce souvisí změna životního stylu a stravovacích návyků a postupný přechod k potravinám, které možnosti prevence nabízejí.

Mutagenezí je označován proces vzniku specifických změn v dědičném materiálu organismu. Jedná se o změny v nukleotidových sekvencích genomu, které jsou nazývány mutacemi. Mutace vznikají působením chemických, fyzikálních nebo biologických faktorů zvaných mutageny. Vědecky je dnes dokázáno, že mutace, tedy specifické změny v molekule DNA, jsou změny dědičné [1]. Většina mutagenních látek působí také karcinogenně [2], je tedy v zájmu každého jedince účinkům působení mutagenních faktorů předcházet.

Potravinou, která v sobě do určité míry skýtá možnost ochrany před nežádoucími vlivy z vnějšího prostředí, je med. Med sice neobsahuje významné množství určité látky nebo skupiny látek, ale obsahuje celý komplex aktivních sloučenin, které na lidský organizmus příznivě působí. Med je nepostradatelný ve výživě dětí, sportovců, rekonvalescentů, ale přínosným je i pro zdravého člověka. Med je zdrojem energie, má zklidňující účinek na nervovou soustavu, odstraňuje únavu nebo naopak nespavost a pomáhá také proti bolestem hlavy [3].

Med bývá velice málo zasažen cizorodými látkami ze životního prostředí. I medy ze znečištěných oblastí splňují obecné limity pro obsah cizorodých látek v potravinách. U medů pocházejících z nektarů je to způsobeno tím, že nektar je chráněn před spadem z ovzduší, nektaria navíc nepropustí cizorodé látky z půdy. U medovicových medů je to z toho důvodu, že ačkoli se medovice nachází na povrchu rostlin, včely ji sbírají okamžitě po jejím vyloučení producenty [4].

Uplatnění v potravě stravě nachází med jako sladidlo do nápojů, čajů či mléka, používá se k přípravě pečiva, medovníků, k dochucení cereálních výrobků a cukrovinek a také k výrobě medoviny, medového piva, likérů apod. [3].

Cílem předložené práce je navázat na předchozí experimenty a s využitím biologických testovacích systémů analyzovat antimutagenní účinky několika druhů medu. Současně budou analyzovány vybrané skupiny aktivních látek typu antioxidantů a posouzen jejich potenciální příspěvek k celkovému biologickému účinku medu.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Včelařství

Včelařství, cizím slovem apidologie, je aplikovaná disciplína entomologie, tedy nauky o hmyzu. Pojem apidologie je odvozen od rodového jména včely medonosné *Apis mellifera* [5].

Chov a činnost včely medonosné přináší člověku med a další včelí produkty (vosk, mateří kašičku, propolis, jed a také pyl). Největším přínosem včel je však jejich opylovací schopnost. Svou opylovací činností se včela přímo i nepřímo podílí alespoň z jedné třetiny na zajišťování lidské výživy [5]. Největší význam má opylování zemědělských hmyzosnubných (entomofilních) plodin. Přínos z opylovací činnosti se v České republice považuje 10 krát vyšší než přínos z dalších včelích produktů. Takovéto porovnání se odvozuje od výskytu včelstev v zemi, v ČR je to cca 6 včelstev na km². Pro srovnání, v USA se přínos z opylování považuje za 143 krát vyšší než přínos ze včelích produktů, což vyplývá z nízké koncentrace včelstev, pouze 0,1 včelstva na km². V ČR je v současnosti evidováno přes 500 000 včelstev [5]. Kromě zemědělsky využívaných plodin včela opyluje i volně rostoucí hmyzosnubné i větrosnubné rostliny [5].

Důležitý je také vliv včely na vytváření životního prostředí. Včela je udržuje, dále rozvíjí, ale především velmi citlivě reaguje na jeho změny v důsledku působení lidské činnosti (toxické imise, pesticidy, apod.). Včela se tak stává velice citlivým bioindikátorem vůči škodlivým látkám v prostředí [5].

3.2 Historie medu

Med patří mezi nejstarší potraviny. Zachovalé skalní kresby vypovídají o tom, že med znal již pravěký člověk. Tyto kresby, staré 15 až 20 tisíc let, znázorňují dva lidi vybírající med včelstvu usídlenému pravděpodobně ve skalní dutině (Pavoučí jeskyně - Cauveas de la Arana, poblíž vesnice Bicorp ve Španělsku) [4]. Med byl též potravou nejstarších národů. Kam až dějiny starověku sahají, vyskytují se zmínky o medu [6]. S úctou se o medu píše v Bibli, Koránu, na egyptských papyrech a v kronikách snad celého světa [3]. V egyptských pyramidách byly objeveny nádoby s medem z doby před 3 tisíci lety a tento med, který byl úplně zkrystalizovaný, byl vhodný k jídlu. Tak dlouhé uchování a v tak dobrém stavu bylo způsobeno tím, že med byl uskladněn v hliněných nádobách zalepených voskem na místě se stálou, nevysokou teplotou (méně než 12 °C) a s velmi nízkou vlhkostí [3].

Pohanským bohům byl předkládán pokrm z medu (Ambrosie). Zeus, odchovanec medové víly Melisy, byl obratným připravovatelem medového nápoje. Báje praví, že když chtěl přepadnout svého otce Krona, nejdříve jej uspal medovinou. Naši předkové věřili, že med není produkován včelami, ale padá z nebe jako boží rosa na květiny, odkud jej včely sbírají a přenášejí do úlů. Homér, Euripides, Ovidius, Vergilius a další opěvovali med pro jeho vzácné vlastnosti. Podle Didona Sicilského byl med hlavní výživou mnoha italských národů. Ovidius při popisování slavnosti bohů líčí lahodnost medových koláčů připravovaných z mouky, medu a oleje. Platón vypráví o obětech bohům ve formě ovoce namáčeného v medu. Při dobývání Indie Alexandrem Velikým poručil Alexandr podmaněným národům, aby odváděli daně ve formě medu a vosku [6]. Staří Indové považovali včelu za posvátné zvíře.

Věřili, že duše zemřelého člověka opouští tělo v podobě včely [3]. Závodníci ve starém Řecku používali med před zápasy k posílení a k dosažení lepších výsledků [3].

Již v dobách starověku byl med považován za prostředek k dosažení dlouhověkosti [3]. V indické knize medicíny se dokonce praví, že pomocí diety, která obsahuje med a mléko, lze život člověka prodloužit až na 500 let [7]. Staří Asýřané kladli do medu mrtvoly, aby je takto zakonzervovali. Již zmíněný Alexandr Veliký byl takto po smrti uložen do medu. Med ovšem sloužil také ke konzervaci ovoce a jiných potravin [3].

Staří Čechové byli výbornými včelaři. Medovinu pili dřív, než se naučili vařit pivo [3]. Karel IV. měl včelaření velmi v oblibě, jeden ze svých lesů pojmenoval včelím hájem a tehdejšímu spolku včelařů daroval listinu, podle které se měli řídit [6].

Med se stal také součástí obřadních pokrmů, například při štědrovečerní večeři se podával oplatek s medem, který měl rodinu ochránit od všeho zlého. Medem se také platily různé pohledávky, dluhy, daně a poplatky [3].



Obr. 1: Kresba z Pavoučí jeskyně [8]

3.3 Nektar

Nektar je sladká tekutina vylučovaná žláznatým pletivem rostlin, tzv. nektariemi. Nektarie mohou být květní a mimokvětní a toto pletivo se vyskytuje především u hmyzosnubných rostlin. Vylučování nektaru bývá ovlivněno jak vnějšími vlivy (sluneční svit, teplota, vlhkost), tak i rostlinou samotnou (genetické dispozice) [4].

3.3.1 Složení nektaru

Nektar je především vodný roztok cukrů, obsah vody se pohybuje v rozmezí 5 - 85 % a obsah cukrů bývá kolem 40 %. V čerstvém nektaru se z cukrů vyskytuje sacharóza, glukóza a fruktóza a jejich poměr je charakteristický pro jednotlivé druhy rostlin [4].

Nektar rozdělujeme do tří skupin [4]:

- nektar obsahující v převaze hexózy (typické pro květy s volnými nektariemi)
- nektar s vyrovnaným obsahem hexóz z disacharidu sacharózy

- nektar s převládajícím obsahem sacharózy (typické pro rostliny s obtížně přístupnými nektariemi)

V menším zastoupení se v nektaru nacházejí také další cukry, například maltóza.

Dusíkaté látky se v nektaru téměř nenacházejí (protein 0,002 - 4,8 mg · 100 mg⁻¹). Minerální látky jsou zastoupeny v malém množství (obsah popelovin 0,02 - 0,45 % sušiny). Z organických kyselin se v nektaru nacházejí kyselina jablečná, vinná, jantarová, citrónová, šťavelová. Z dalších látek se v nektaru nacházejí pryskyřičnaté látky, aromatické silice a také terpeny, které nektaru dodávají specifickou chuť a vůni. Jako barviva jsou zde zastoupeny flavony. V některých nektarech se vyskytuje vitamin C. Z buněk nektarií do nektaru pronikají enzymy s inverzním účinkem. V nektaru dále bývají obsaženy také pevné příměsi, například pylová zrna, buňky rostlinných tkání. Obvyklé pH se pohybuje v rozmezí 2,7 - 6,4 [4].

3.4 Medovice

Tuto sladkou a hustou tekutinu vylučuje hmyz řádu stejnokřídlí (*Homoptera*). Nejvýznamnějšími producenty medovice u nás jsou mšice, červci a puklice, méně pak mery. V našich podmínkách jich žije více než tisíc druhů, význam pro včelaře však má pouze 40 z nich. Tento hmyz cizopasí na větvích, listech a pupenech většiny listnatých a jehličnatých dřevin [4, 9].

Sítkovicemi (pletivem) rostlin proudí rostlinná šťáva, kterou producenti medovice nasávají pomocí ústních orgánů a odtud dále proudí vlivem vyvinutého podtlaku do trávicího traktu. Takto ze sítkovic nasají producenti medu velké množství mízy, ta však obsahuje málo živin a navíc v nevhodném poměru, proto míza dále prochází zvláště uzpůsobeným trávicím ústrojím, kde se nachází filtrační komora, která rostlinnou šťávu před vlastním trávením upraví. Filtrační komora je tvořena tenkou blankou, přes ni vlivem osmotického tlaku pronikají látky s nízkou molekulární hmotností, především jednoduché sacharidy a voda. Do žaludku proudí už jen zahuštěný koncentrát s nižším obsahem cukru a naopak vyšším obsahem ostatních látek. Vzniklý filtrát je odveden do výkalového vaku a odtud je vytřikován ve formě medovice z těla ven, ulpívá na listech či jehlicích, odkud je sbírán včelami [4].

3.4.1 Složení medovice

Medovice je z chemického hlediska složitá látka. Obsah vody se pohybuje okolo 16,3 %, někdy se však uvádí hodnota až 50 %, přičemž čerstvá medovice může obsahovat až 80 % vody. Míza proudící v sítkovících obsahuje 98 % vody. Obsah vody již vyloučené medovice je závislý na době, po kterou se medovice nacházela ve vnějším prostředí [4].

Hlavní složku medovice tvoří cukry, více druhově zastoupeny než v nektaru. Původní cukry rostlinné šťávy jsou některými enzymy měněny na jiné [9]. Ve větší míře je zastoupena sacharóza, glukóza, fruktóza, v menší míře maltóza, melezitóza, rafinóza, trehalóza a také polysacharidy. Aminokyseliny se v medovici nacházejí v nižší koncentraci než v původním rostlinném roztoku, druhové zastoupení je však bohaté, např. alanin, kyselina asparagová, arginin, kyselina glutamová, histidin, leucin, lysin aj., všechny jsou původu rostlinného. V medovici se dále nacházejí minerální látky, vitamíny, barviva. Hodnota pH se pohybuje mezi 6,7 - 7,5 [4].

Na jedné rostlině může parazitovat více druhů producentů medovice, přesto mohou tvořit medovici o různém složení. V trávicím traktu producentů totiž dochází k biochemickým procesům, které upravují složení cukrů, tzv. transglukozidace [4]. Například rostlinná šťáva ze sítkovic neobsahuje sacharid melezitózu, v medovici je již však obsažena. Vzniká tedy působením invertáz v trávicím traktu některých producentů medovice [5]. Složení medovice tedy nemusí odpovídat složení původní mízy [4].

3.5 Vznik medu

Med a také ostatní včelí produkty jsou produkty společné činnosti včelstva jako jednoho celku; jediná včela není schopna z nasátého nektaru nebo medovice med vytvořit [5]. Většina biologicky důležitých látek se do medu dostává prostřednictvím včely v samotném procesu tvorby medu. Včely sbírají potravu vždy, když je dostupná, tzn. když je snůška. Sběr tedy nezávisí jen na hladu včely či celého včelstva. Zdroje potravy vyhledávají včely létavky. Využívají přitom především čich. Sbírají-li nektar, využívají také zrak. Hmyzosnubné rostliny produkující nektar mají obvykle barevné okvětní lístky, které opylovatele přilákají. Včela sběratelka nasaje nektar nebo medovici a posune jej až do medného váčku, který se nachází v roztažitelném zadečku. Při polykání přidává do nasáté tekutiny výměšky svých žláz, které ústí do dutiny ústní a hltanu. Nejdůležitější jsou žlázy hltanové, pocházejí z nich vitaminy skupiny B, většina aminokyselin, různé enzymy a další látky, které pomáhají přetvářet původní surovinu v med. Včely sběratelky nasávají sosákem a následně přinášejí do úlu v medném váčku sladkou šťávu sladinu, v úlu ji předají úlovým včelám (přejímatelkám). Tyto včely šťávu spolknou a poté ji ještě několikrát předají dále než vznikne řídký med, který může být uložen do buňky plástu. Během předávání ve šťávě dochází k celé řadě fyzikálně-chemických procesů [5]:

- a) obohacení o látky pocházející z hltanových žláz a patrně i z pyskových žláz včel dělnic:
 - enzymy - invertáza, diastáza, glukooxidáza
 - aminokyseliny - především prolin
 - látky ve stopovém množství - tuky, vitamíny skupiny B
- b) chemické změny - štěpení disacharidů a vyšších cukrů na monosacharidy a cukry nižší
- c) fyzikální změny - zahuštění

K zahušťování dochází, aby byl v medu zvýšen osmotický tlak a zabránilo se tak množení mikroorganismů. Po dostatečném zahuštění jsou buňky v plástech tímto medem plněny až po okraj a zavíčkované voskovými víčky. Med je dostatečně vyžrálý, trhne-li se plástem a med již nevystříkne. Jedno včelstvo může během dne nasbírat 1 - 2 kg nektaru či medovice. Za jednu sezónu je možné od včelstva získat maximální výnos až 100 kg medu [5].

3.6 Definice medu

Definice podle legislativy [10]

Vyhláška Ministerstva zemědělství č.76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kaka, čokoládu a čokoládové bonbony (ve znění pozdějších předpisů)

§ 7

Pro účely této vyhlášky se rozumí

a) medem - potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástech,

b) medem květovým (nektarovým) - med pocházející zejména z nektaru květů,

c) medem medovicovým - med pocházející zejména z výměšků hmyzu (Hemiptera) sajícího z rostlin na živých částech rostlin nebo ze sekretů živých částí rostlin,

d) pastovým medem - med, který byl po získání upraven do pastovité konzistence a je tvořen směsí jemných krystalů,

e) vytočeným medem - med získaný odstředováním odvíčkových bezplodových plástů,

f) plástečkovým medem - med uložený a zavičkováný včelami do bezplodových plástů čerstvě postavených na mezistěnách vyrobených výhradně ze včelího vosku nebo bez nich a prodáváný v uzavřených celých plástech nebo dílech takových plástů,

g) vykapaným medem - med získaný vykapáním odvíčkových bezplodových plástů,

h) medem s plástečky - med, který obsahuje jeden nebo více kusů plástečkového medu,

i) lisovaným medem - med získaný lisováním bezplodových plástů za použití mírného ohřevu do 45 °C nebo bez použití tepla,

j) filtrovaným medem - med, který byl po získání upraven odstraněním cizích anorganických nebo organických látek takovým způsobem, že dochází k významnému odstranění pylu,

k) pekařským medem (průmyslovým medem) - med určený výhradně pro průmyslové použití nebo jako složka do jiných potravin; může mít cizí příchut' nebo pach, může vykazovat počínající kvašení nebo mohl být zahřát.

§ 8 Členění medu

Med se člení:

a) podle původu

1. květový,
2. medovicový,

b) podle způsobu získávání a úpravy

1. vytočený med,
2. plástečkový med,
3. lisovaný med,
4. vykapaný med,
5. med s plástečky,
6. filtrovaný med,
7. pastový med

§ 9 Označování

(1) Kromě údajů uvedených v zákoně a v prováděcím právním předpisu se med dále označí

a) podle jeho původu podle § 8 písm. a) a podle způsobu jeho získávání a úpravy podle § 8 písm. b); v případě, že se jedná o vytočený med, nemusí být způsob získávání a úpravy uveden,

b) zemí původu, kde byl med získán; pokud se jedná o směs medů pocházejících z více zemí Evropské unie nebo ze třetích zemí, lze jej označit příslušným názvem:

1. "směs medů ze zemí ES",
2. "směs medů ze zemí mimo ES",
3. "směs medů ze zemí ES a ze zemí mimo ES".

(2) Označení medu, s výjimkou filtrovaného medu a pekařského medu (průmyslového medu), může být doplněno následujícími údaji:

a) regionálním, územním nebo místním označením původu, pokud výrobek pochází zcela z uvedeného zdroje původu,

b) ve vztahu k původu medu [§ 8 písm. a)] názvem "jednodruhový" nebo "smíšený",

c) druhem rostlin, z nichž pochází, pokud výrobek pochází zcela nebo převážně z uvedeného druhu a má odpovídající organoleptické, fyzikálněchemické a mikroskopické charakteristiky,

d) specifickými kritérii jeho jakosti.

(3) Pekařský med (průmyslový med) se kromě údajů uvedených v zákoně a v prováděcím právním předpisu²⁾ označí slovy "pekařský med" nebo "průmyslový med" a dále zemí původu podle odstavce 1 písm. b).

(4) Pekařský med (průmyslový med) musí být na všech obalech označen v blízkosti názvu údajem, že med je určen pouze na vaření, pečení nebo jiné zpracování.

(5) Pokud je pekařský med (průmyslový med) použit jako složka potravin, může být v názvu této potravin použit termín "med" namísto termínu "pekařský med" nebo "průmyslový med"; v seznamu složek se však vždy uvede název "pekařský med" nebo "průmyslový med".

(6) Přípustné záporné hmotnostní odchylky u spotřebitelského balení jsou uvedeny v příloze č. 3 tabulce 3.

§ 10 Požadavky na jakost

(1) Do medu nesmí být přidány, s výjimkou jiného druhu medu, žádné jiné látky včetně přídatných látek.

(2) Z medu nesmí být odstraněn pyl ani jakákoli jiná složka, s výjimkou případů, kdy tomu při odstraňování cizích látek, zejména filtrací, nelze zabránit.

(3) Med, s výjimkou pekařského (průmyslového) medu, nesmí

a) mít jakékoliv cizí příchutě a pachy,

b) začít kvasit nebo pění,

c) být zahřát do takové míry, že jeho přirozené enzymy jsou zničeny nebo se stanou neaktivní.

(4) U medu nesmí být uměle změněna kyselost.

(5) Filtrovaný med a pekařský (průmyslový) med nesmí být přidáván do jiných medů uvedených v § 8.

(6) Smyslové, fyzikální a chemické požadavky na jakost jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.

Tab. 1: Smyslové požadavky [10].

Med	Konzistence a vzhled	Chuť	Barva
květový	mírně až silně viskózní, tekutý, částečně až plně krystalický	výrazně sladká až škrablavá	vodově čistá až s nazelenalým nádechem, slabě žlutá až zlatavě žlutá
medovicový	mírně až silně viskózní, tekutý, částečně až plně krystalický	sladká, popřípadě kořeněná až mírně škrablavá	tmavohnědá s nádechem do červenohněda

Tab. 2: Fyzikální a chemické požadavky [10]

Požadavek	Druh medu		
	květový	medovicový	pekařský (průmyslový)
součet obsahu fruktózy a glukózy (% hmot. nejméně)	60,0	45,0	-
obsah sacharózy (% hmot. nejvýše)	5,0	5,0	-
obsah vody (% hmot. nejvýše)	20,0	20,0	23,0
kyselost (mekv/kg nejvýše)	50,0	50,0	80,
hydroxymethylfurfural (mg/kg nejvýše)	40,0	40,0	-
obsah ve vodě nerozpustných látek (% hmot. nejvýše)	0,10	0,10	-
elektrická vodivost ($\text{mS} \cdot \text{m}^{-1}$)	nejvýše 80,0	nejméně 80,0	-
aktivita diastázy (stupňů podle Schadeho nejméně)	8,0	8,0	-

Některé specifické fyzikální a chemické požadavky, viz Vyhláška č. 76/2003 Sb., v platném znění.

Tab. 3: Příпустné záporné hmotnostní odchylky od spotřebitelského balení [10].

Hmotnostní rozsah (g)	Hmotnostní odchylka (%)
do 100 g	- 8,0
větší než 100 do 250 včetně	- 5,0
větší než 250 do 500 včetně	- 3,0
nad 500	- 1,0

3.7 Klamání spotřebitele

Stejně jako u ostatních potravin, i u medu se čas od času vyskytnout nějaké nesrovnalosti. Jedná se např. o prodej nepravého medu, uvedení nesprávných údajů ohledně rostlinného a geografického původu, nesprávné zařazení do skupiny apod. [4].

3.7.1 Med falšovaný

Nejčastějším způsobem falšování medu je přidávání cukerných sirupů připravených z cukrové třtiny nebo kukuřice. Tyto sirupy lze snadno vyrobit chemickou nebo enzymovou hydrolýzou přítomných sacharidů na fruktózu a další monosacharidy. Sirupy se používají k výrobě nápojů a také krmení včel. Jejich složení závisí na zpracování a na účelu pozdějšího použití. Takzvaný sirup HFCS (Hight Fructose Corn Syrup) je velmi podobný medu. Přidávání cukerných sirupů na bázi enzymů lze odhalit jen velmi obtížně, jedná-li se o směs sirupu a medu, je rozpoznávání o to těžší, že zůstanou zachovány organoleptické vlastnosti i mikroskopický obraz (tj. množství a druhovost pylových zrn) [4].

Chemickou cestou lze odhalit látky medu cizí, pocházející tedy ze sirupu. Mohou to být dextriny, oligosacharidy z řepných cukrů, původní rostlinné částičky. Mohou být také odhaleny nesrovnalosti v obsahu různých látek, jejichž obsah se změní právě přidáním sirupu, takové látky jsou např. prolin nebo některé enzymy.

Odhalit příměs HFCS v množství 7 % umožňuje metoda založená na poměru dvou izotopů uhlíku o atomové hmotnosti 12 a 13, které jsou v medu obsaženy. Poměr těchto izotopů je ve složkách pocházejících z kukuřice či cukrové třtiny jiný.

3.7.2 Med nepravý

Podle směrnice EU je med nepravý (též cukrářský) definován jako výrobek, který je vhodný ke konzumaci, avšak některé z jeho vlastností mu nedovolují nést označení „med“. Takový med obsahuje stopy fermentace, chuť a vůně není charakteristická pro med, konzistence či jiné vlastnosti mohou být ovlivněny zahřátím nebo dlouhodobým skladováním. Někdy je med natolik podřadné kvality, že nemůže být konzumován bez předchozích dalších úprav [4].

3.7.3 Med nesprávně označený

Problém nesprávného označení se týká především jednodruhových medů a medů přivezených ze zahraničí. Medy ze zahraničí musí být označeny zemí původu, a to i jsou-li míchány s medy tuzemskými [4].

3.8 Propolis

Propolis vytváří pouze včela medonosná. Je to směs včelího vosku a pryskyřic, které včely sbírají z rostlin (např. topol, osika, slunečnice, některé jehličnany apod.), především z jejich květních a listových pupenů [5].

Než včely pryskyřice uloží do pylových košíčků, zpracovávají je kusadly a přidávají tak do nich výměšky svých žláz. To vysvětluje skutečnost, proč propolis obsahuje flavonoidy ve formě aglykonů (molekuly neobsahující cukr) a nikoli ve formě glykosidů, ve které se nacházejí v rostlinném materiálu a zodpovídají za zabarvení rostlin [5].



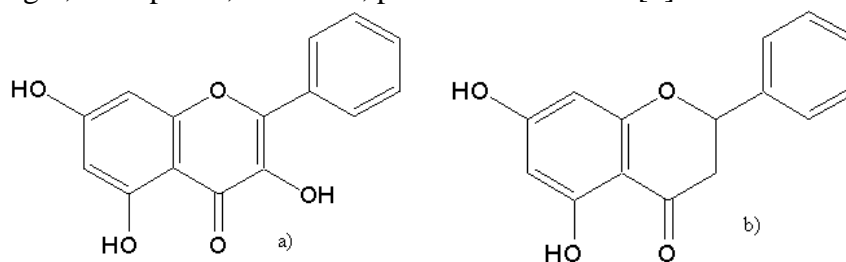
Obr. 2: Propolis, který byl podroben analýzám.

Propolis slouží včelám k „opravám“ úlu, utěšňují jím různé trhliny a otvory. Rovněž s ním potírají vnitřní část úlu, přičemž tak využívají jeho antibakteriálních vlastností. Bylo prokázáno, že propolis potlačuje pro včely patogenní bakterii *Paenibacillus larvae* způsobující mor plodu [5].

Barva propolisu závisí na botanickém původu a mění se od žluté až k tmavě hnědé. Propolis je rozpustný v ethanolu, etheru, glykolu. Hustota propolisu se pohybuje v rozmezí $1,120 - 1,136 \text{ g.cm}^{-3}$ a závisí především na obsahu včelího vosku, jehož hustota je $0,956 - 0,969 \text{ g.cm}^{-3}$ [5].

Z chemického hlediska závisí složení propolisu především na druzích rostlin, jež jsou včelám pro jeho sběr dostupné, dále na roční době, kdy je sbírán, plemenu včelstva a na obsahu včelího vosku. Propolis má proměnlivou vůni a také léčivé účinky [5].

Doposud bylo v propolisu analyzováno na 200 látek. Mnohdy až 50% podíl na obsažených látkách mají flavonoidy, fenolické kyseliny a jejich estery. Právě flavonoidy se největší mírou podílejí na antibakteriálních účincích propolisu, dosud bylo identifikováno na 40 sloučenin, především galangin, kaempferol, kvercetin, pinocembrin a další [5].



Obr. 3: Struktura dvou z mnoha flavonoidů obsažených v propolisu a) galangin [11], b) pinocembrin [12]

Tab. 4: Chemické složení propolisu [5]

skupina látek	% zastoupení
látky pryskyřičné povahy	45 - 55 %, flavonoidy, fenolové kyseliny, jejich estery
vosky a mastné kyseliny	25 - 35 %, nejvíce ze včelího vosku, možný i rostlinný původ
éterické oleje	až 10 %
jiné organické a minerální látky	5 %

Nejvýznamnějšími vlastnostmi propolisu jsou jeho antibakteriální účinky. V závislosti na koncentraci propolisového extraktu, mohou být účinky mikrobistatické až mikrobicidní. Propolis je účinný zejména proti některým druhům bakterií, virů, vláknitých hub a kvasinek, některým hlísticím a prvokům. V některých případech propolis vykazuje výraznější účinky než některá synteticky připravená antibiotika.

V lékařství obecně nachází uplatnění při léčení kardiovaskulárních chorob, anémie, infekcí dýchacích cest, při vředových chorobách, popáleninách, mykózách, stomatologických potížích a mnoha dalších [5].

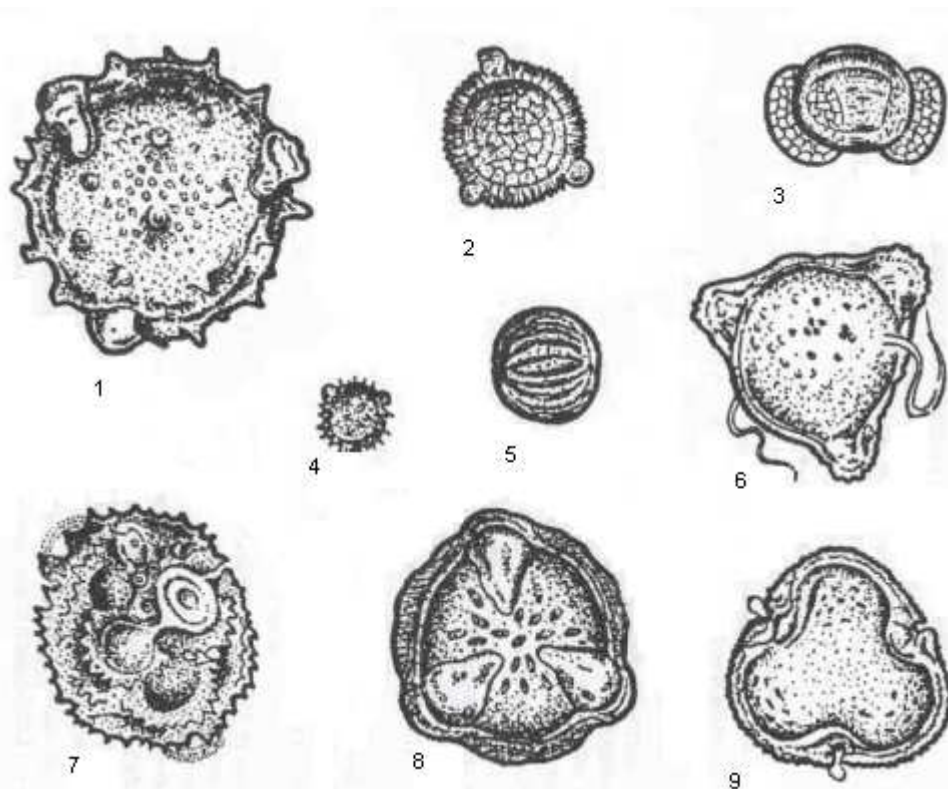
3.9 Pyl

Analýza pylového zrna je dnes hojně využívanou metodou ke stanovení geografického původu medu. Pylová zrna obsahují sacharidy, především pak polysacharidy, 10 % lipidů, bílkoviny, enzymy, flavonoidní a karotenoidní barviva. Pylová zrna se analyzují také v propolisu a mateří kašičce, aby i zde bylo možno určit geografický původ. Nauka o poznávání pylových zrn se nazývá palynologie a odtud název melissopalynologie pro rozpoznávání pylových zrn v medu [4].

V medu se kromě pylu, který především u medovicových medů pochází od větrosnubných rostlin, dále nacházejí rostlinné a živočišné příměsi jako spory, hyfy hub, řasy kvasinky, úlomky chitinu, chloupky hmyzu, trichomy apod [4].

Na pylovou analýzu existují dva odlišné názory. Jeden říká, že tato metoda není spolehlivá, druhý, že přes všechny své nedostatky, může metoda posloužit k identifikaci pylového spektra a rozpoznat tak geografický a botanický původ medu [4].

Pylová analýza lze rovněž použít pro stanovení typu medu, jedná-li se o med květový, medovicový či smíšený [4]. Za určitých podmínek může odhalit některá porušení medu, např. přídavek cukerného sirupu. V tomto ohledu však nelze metodu považovat za rozhodčí, může pouze poukázat na možné pochybení a navést analyzátor k dalším, rozhodčím metodám [4].



Obr. 4: Ukázka pylových zrn některých našich rostlin. 1- pcháč oset (*Girsinium arvense*), 2- rdesno pepelník (*Polygonum*), 3- borovice lesní (*Pinus silvestris*), 4- devětsil lékařský (*Petasites officinalis*), 5- vítod (*Polygala*), 6- vrba úzkolistá (*Chamaenerion angustifolium*), 7- smetanka lékařská (*Taraxacum officinale*), 8- javor klen (*Acer pseudoplatanus*), 9- lípa srdčitá (*Tilia cordata*) [9].

3.10 Fyzikální vlastnosti medu

3.10.1 Viskozita medu

Z důvodu vysokého obsahu sacharidů má med poměrně vysokou viskozitu, při 20 °C to je 18,0 - 19,0 Pa.s. Většina medů patří mezi newtonovy kapaliny, tzn. viskozita je pouze funkcí teploty a nezávisí na rychlosti míchání. Některé medy projevují thixotropní vlastnosti (thixotropie je vratná přeměna koloidního roztoku na koloidní suspenzi vlivem působení mechanických sil [13]). Takové medy mají rosolovitou konzistenci, tzn. mají extrémně vysokou viskozitu [5]. Jiné medy mají dilatantní vlastnosti, tzn. po prudkém zamíchání jejich viskozita vzroste [4].

3.10.2 Hustota medu

Hustota medu souvisí s obsahem vody. Pohybuje se v rozmezí od 1,4404 g.cm⁻³ pro obsah vody 14 % do 1,3550 g.cm⁻³ pro obsah vody 21 % [4].

3.10.3 Hygroskopicitu medu

Hygroskopicitu látek je schopnost pohlcovat a udržovat vlhkost z okolního prostředí. Med je silně hygroskopický již při pokojové teplotě. Tato skutečnost je způsobena především obsahem velmi hygroskopické fruktózy [4].

3.10.4 pH medu

U nektarových a smíšených medů se pH pohybuje v rozmezí 3,1 - 4,5, v průměru 3,9. U medů medovicových se průměrná hodnota pohybuje okolo 4,9 [4].

3.10.5 Povrchové napětí

Povrchové napětí je závislé na původu medu. Med má obecně nízké povrchové napětí a proto se používá v kosmetických přípravcích jako hydratační medium. Povrchové napětí a vysoká viskozita způsobují pěnu na povrchu medu, která obsahuje především bílkoviny a dále pylová zrna, nečistoty, kousky vosku [5].

3.10.6 Barva

Rozsah barevnosti se pohybuje od téměř průhledné až po černou. Většinou barva spadá do odstínů jantarové žluti. Barva medu závisí především na původu, stáří a podmínkách skladování. Průhlednost popřípadě průsvitnost závisí na přítomných částechkách, např. pylu. Zkrystalizovaný med je vždy světlejší než jeho tekutá forma, to protože krystalky glukózy jsou bílé. Přesnou metodou k určení barvy medu je absorpční spektrofotometrie [5].

3.10.7 Optická rotace

Optická rotace představuje schopnost sloučeniny stáčet rovinu polarizovaného světla. Nektarové medy jsou levotočivé (převaha levotočivé fruktózy), medovicové medy jsou pravotočivé (převaha pravotočivé glukózy, případný obsah melecitózy). Medy smíšené mají různou polarizaci [5].

3.11 Chemické složení medu

3.11.1 Obsah vody

Celkový obsah vody, a tím také obsah sacharidů, závisí na zralosti a původu medu. Dle legislativy by obsah vody neměl být vyšší než 20 %. Je-li obsah vody vyšší než 22 %, je možné med považovat za nezralý. Je-li obsah vody nad 25 %, med již podléhá fermentaci. Pokud je množství vody nižší než 17,1 %, k fermentaci nedochází. V rozmezí hodnot 17,1 - 20 % závisí fermentace na obsahu osmofilních kvasinek.

Množství vody obsažené v medu závisí také na skladovacích podmínkách, a to je-li med skladován v suchém či vlhkém prostředí. Vyšší obsah vody v medu se může vyskytnout také v oblastech s vyšší atmosférickou vlhkostí [4].

3.11.1.1 *Fermentace medu*

K fermentaci medu dochází během skladování vlivem působení osmofilních kvasinek. Důležitou roli zde hrají teplota a obsah vody. Kvašení snadno podléhá med, jež byl vytočený nezralý a řídký. Avšak i správně vyzrálý med přijímá atmosférickou vlhkost, takže se může

stát, že horní vrstva medu dosáhne takového obsahu vody, který je již vhodný pro růst kvasinek a dalších mikroorganismů v medu obsažených.

Na fermentaci má dále vliv i poměr vody ku množství kvasinek. Med s obsahem:

- < 17,1 % vody nepodlehne fermentaci ani při obsahu 100 000 a více KTJ na 1 g medu,
- 17,1 - 18,0 % vody by neměl podlehnout fermentaci v případě, že obsahuje méně než 1000 KTJ na 1 g medu
- 18,1 - 19,0 % vody by neměl podlehnout fermentaci v případě, že obsahuje méně než 10 KTJ na 1 g medu
- 19,1 - 20,0 % vody by neměl podlehnout fermentaci v případě, že obsahuje méně než 1 KTJ na 1 g medu
- > 20,0 % vody je velmi náchylný k fermentaci

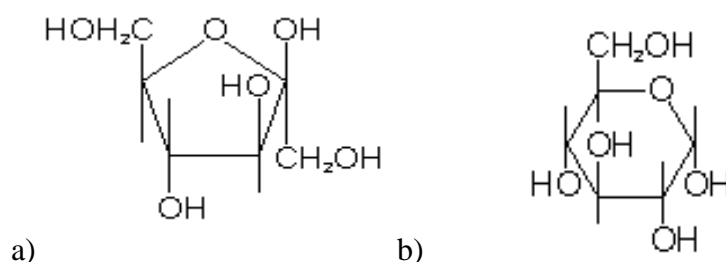
3.11.2 Sacharidy v medu

Největší zastoupení z jednotlivých výživových látek obsažených v medu mají právě sacharidy. Obsah sacharidů se v průměru pohybuje v rozmezí 80 - 85 % (95 - 99 % sušiny medu). Med je tedy přesycený vodný roztok sacharidů, který zároveň obsahuje i řadu dalších látek. Vysoká koncentrace sacharidů má vliv na jakost medu, organoleptické vlastnosti (chuť, konzistence, vzhled), energetickou hodnotu ($1\,428\text{ kJ}/100\text{ g}^{-1}$), viskozitu [4].

3.11.2.1 Zastoupení a obsah jednotlivých sacharidů

V medu jsou nejvíce zastoupenými sacharidy fruktóza (tzv. ovocný cukr) a glukóza (tzv. hroznový cukr). Tyto monosacharidy vznikají reakcí zvanou enzymatická hydrolýza, a to z disacharidu sacharózy (tzv. řepný cukr), který je obsažen v nektaru nebo medovici. Ze sacharózy vzniká ekvimolární směs D-fruktózy a D-glukózy, tzv. invertní cukr. Ve stopových množstvích se v invertním cukru nacházejí také některé málo běžné oligosacharidy.

Výskyt dalších monosacharidů nebyl zatím v medu prokázán [4, 14].



Obr. 5: Strukturní vzorce a) D-fruktózy, b) D-glukózy [15]

Naopak oligosacharidů bylo v medu prokázáno již více než 20. Především jsou to disacharidy maltóza, izomaltóza, sacharóza a dále kojibióza. Obsah sacharózy v medu je přibližně 2 - 3 % [4]. Enzym invertáza ji rovným dílem štěpí na glukózu a fruktózu [9]. Její obsah v medu je v porovnání s nektarem velmi nízký, to je způsobeno tím, že nedochází k její úplné hydrolýze. Obsah sacharózy v medu kolísá, velmi záleží na stupni zralosti medu. Pokud med dozrává příliš rychle, obsah sacharózy je nižší a obsah sacharidů tedy vyšší. Ve většině případů závisí obsah disacharidů na druhu rostliny, oblasti, ročním období apod. [4].

V medech se také mohou vyskytovat dextriny. Jsou specifické pro med, protože mají nižší molekulovou hmotnost než dextriny škrobové [5]. Jejich obsah ovlivňuje tekutost medu, více dextrinů se nachází v medech medovicových [4]. V přineseném nektaru či medovici nejsou dextriny obsaženy buď vůbec nebo jen v minimálním množství. Jejich obsah roste během zrání a především skladování medu [5].

Z trisacharidů se v medech nacházejí např. erlóza, theanderóza, panóza, melezitóza, z vyšších sacharidů to jsou např. isomaltotetróza, isomaltopentóza [4].

3.11.2.2 *Peroxidázová a neperoxidázová aktivita, osmotický účinek sacharidů*

Med vykazuje antibakteriální aktivitu, která se projevuje výrazným inhibičním účinkem na mnohé bakteriální rody jako je *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides* a další enteropatogeny. Tato aktivita je dána obsahem tzv. peroxidasových a neperoxidasových faktorů. Největší význam z neperoxidázových faktorů má osmotický účinek sacharidů.

Mezi peroxidázové faktory patří například přítomnost peroxidu vodíku. Ten vzniká při enzymatickém štěpení glukózy na kyselinu glukonovou a právě H_2O_2 . Mechanismus působení peroxidu není zatím příliš jasný, protože peroxid se záhy rozkládá na vodu a kyslík a tato reakce probíhá po celou dobu zrání [4].

3.11.2.3 *Sladkost medu*

U různých medů je sladká chuť různá a závisí především na obsahu jednotlivých sacharidů. Nejvyšší sladkost ze sacharidů obsažených v medu má fruktóza. Celková sladkost však záleží také na některých dalších látkách obsažených v medu. Přestože se mohou vyskytovat v nepatrném množství, jejich přítomnost může sladkost snížit nebo naopak zvýšit. Například nepatrné množství kuchyňské soli zvyšuje sladkost [4].

Sladkost může být také ovlivněna teplotou a přítomností kyselin. Obecně přítomnost kyselin sladkost fruktózy snižuje, ale mírné okyselení chladného roztoku může sladkost zvýšit. Sladkost fruktózy tedy roste s klesající teplotou [4].

3.11.3 Další látky obsažené v medu

3.11.3.1 *Aromatické látky*

Aromatické látky obsažené v medu jsou látky těkavé s nízkým bodem varu dodávající medu charakteristické aroma. V medu se nachází přes 300 těchto sloučenin, dodnes identifikováno jich je zhruba 200. Můžeme zde zařadit estery alifatických a aromatických kyselin, alkoholy, aldehydy, ketony a další. Některé látky jsou typické jen pro některý druh medu. Např. pro med z citrusových stromů a levandule je to methylester kyseliny anthranilové [4].

3.11.3.2 *Barviva*

Barvu medu ovlivňují barviva převážně rostlinného původu [9]. Jsou to například fenolické sloučeniny, dále produkty Maillardových reakcí, které vznikají reakcí aminokyselin a fruktózy v kyselém prostředí, minerální látky a organické kyseliny [4].

Ze skupiny flavonoidních barviv je to kvercetin a rutin (glykosid kvercetinu) s protisklerotickým účinkem [9].

3.11.3.3 Organické kyseliny

Organické kyseliny jsou velmi důležitou součástí medu, přestože jsou zastoupeny ve velmi malém množství (cca 0,5 %). Ovlivňují barvu medu, pH a vodní aktivitu [4]. Med obsahuje přibližně 20 organických kyselin. Hlavní kyselina obsažená v medu je kyselina glukonová, která vzniká při oxidaci glukózy glukooxidázou a je v rovnováze se svým laktone. Druhou nejvíce zastoupenou kyselinou v medu je kyselina jablečná. Původ této kyseliny není znám [4].

U většiny organických kyselin zastoupených v medu je jejich zdroj neznámý. Mohou to být meziproducty Krebsova cyklu a být přítomny již v nektaru, mohou také vznikat z glukózy, fruktózy nebo sacharózy v nektaru působením enzymů vylučovaných včelami při zrání medu [4]. Kyselina mravenčí a levulová vznikají rozkladem hydroxymethylfurfuralu [5].

3.11.3.4 Minerální látky

Zdrojem minerálních látek obsažených v medu je půda. Přes rostlinu se dostanou až do pylu a nektaru. Celkový obsah minerálních látek v medech se pohybuje v rozmezí 0,02 % - 1,0 %.

Nejvíce minerálních látek se nachází v pylu. Nejvyšší hladinu minerálních látek mají medy medovicové a vřesové [4]. Pro medovicové medy je charakteristický obsah stříbra, molybdenu, vanadu a cínu [5].

Tab. 5: Srovnání obsahu minerálních látek vyskytujících se ve světlých a tmavých medech [4].

Minerální látky	Průměrné množství ve světlých medech [mg.100 g ⁻¹]	Průměrné množství v tmavých medech [mg.100 g ⁻¹]
draslík	20,5	167,6
chlor	5,2	11,3
síra	5,8	10,0
sodík	1,8	7,6
vápník	4,9	5,1
fosfor	3,5	4,7
hořčík	1,9	3,5
železo	0,24	0,94
mangan	0,03	0,41
měď	0,03	0,06

3.11.3.5 Proteiny

V medu se vyskytují také proteiny. Jsou původu rostlinného i včelího. Obvyklý obsah proteinů se pohybuje okolo 0,2 %. Výjimkou je med vřesový, kde se obsah pohybuje kolem 1,5 %, někdy až 1,85 %. Takto vysoký obsah proteinů zapříčiňuje také specifické tixotropní

vlastnosti tohoto medu. Med produkovaný včelami, které jsou krmeny cukernou stravou (tzv. dokrmování) má proteinů méně než je obvyklý obsah [4].

3.11.3.6 Aminokyseliny v medu

Běžné množství aminokyselin přítomných v medu je $100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ sušiny. Aminokyseliny jsou obsaženy v nektaru, medovici, především však v pylu. Zdrojem určitého množství aminokyselin je také samotná včela. Aminokyselinové složení medu může být použito k prokázání jeho botanického či geografického původu [4].

Nejvíce zastoupenou aminokyselinou je prolin. Z celkového obsahu aminokyselin obsažených v medu tvoří 50 - 85 %. Jeho role spočívá v regulaci sekrece invertázy během zrání medu [4].

3.11.4 Enzymy v medu

Enzymy v medu obsažené jsou látky nezbytné pro přeměnu nektaru a medovice v med. Jsou to termolabilní sloučeniny, jejich snížený obsah může poukazovat na nevhodné a nežádoucí tepelné ošetření medu. S prodlužující se dobou skladování se rovněž snižuje aktivita enzymů.

Podle původu se enzymy obsažené v medu rozdělují do tří skupin [4]:

3.11.4.1 Enzymy včelího původu

Nektar a medovice jsou přeměňovány na med působením enzymů hypopharyngeálních žláz včel (hypopharynx = lat. hrtanová část hltanu):

a) invertáza (α -glukosidáza, sacharáza)

Sacharózu obsaženou v nektaru invertuje na glukózu a fruktózu. V určitém množství se nachází také ve zralém medu a tak přeměna může dále probíhat i během skladování. Množství invertázy vyloučené včelami záleží na věku, fyziologickém stadiu, potravě včel, na síle roje, teplotě a množství posbíraného nektaru. Invertáza hydrolyzuje také maltózu, má transglukosidázovou aktivitu. Invertáza je citlivější k teplotě více než jiné enzymy medu, v některých zemích je dána jako legislativní parametr [4].

V roce 1986 byla v medu zjištěna přítomnost β -glukosidázy. Doposud však nebylo prokázáno, je-li původu včelího nebo rostlinného [4].

b) glukózaoxidáza

Oxiduje glukózu na kyselinu glukonovou a H_2O_2 . Kyselina glukonová je hlavní kyselina obsažená v medu a peroxid vodíku je považován za příčinu antibakteriálních vlastností medu (viz. kap. 3.11.2.2). Glukooxidáza vedle glukózy oxiduje také manózu [4]. Enzym je aktivní ve zředěném nebo nezralém medu. S rostoucím obsahem sacharidů klesá jeho aktivita, v nezralém medu je aktivita nulová. Optimální pH pro tento enzym je přibližně 6,1 [4].

c) amyláza (diastáza)

Štěpí škroby obsažené v medu. Je to termolabilní látka (avšak termostabilnější než invertáza). Aktivita závisí na rostlinném zdroji, nízká aktivita může signalizovat zahřátí medu.

Parametr aktivity amylázy je v některých zemích dán legislativně. Význam amylázy v medu není doposud dostatečně objasněn, předpokládá se, že napomáhá trávení pylu. Optimální pH pro tento enzym je přibližně 5,0 - 5,3 [4].

3.11.4.2 Enzymy pocházející z jiného sociálního hmyzu

Dalšími druhy hmyzu, které mohou vylučovat invertázu do šťáv rostlin, jsou například mravenci, čmeláci, vosy. Tento hmyz dále vylučuje glukooxidázu, která přímo souvisí s glukooxidázovou aktivitou (viz. kap.3.11.2.2) [4].

3.11.4.3 Enzymy rostlinného původu

Rostlinného původu jsou enzymy pocházející z nektaru, medovice nebo pylu. Jejich obsah závisí na druhu rostliny. Význam těchto enzymů na průběh zrání medu není dosud přesně objasněn, předpokládá se však jen minimální vliv [4].

a) kataláza

Obsah katalázy souvisí s glukózaoxidázovou aktivitou. Medy s nízkým obsahem katalázy vykazují vysokou hladinu H_2O_2 . Jedná se například o medy z nektaru jetele plazivého (*Trifolium repens*) nebo z medovice skotské borovice (*Pinus sylvestris*). Naopak vysokou katalasovou aktivitu vykazují například med vřesový (*Vaccinium myrtillis*) nebo borůvkový (*Erica spp.*) [4].

b) kyselá fosfatáza

V medu se vyskytuje fosfatáza převážně původem z pylu, částečně původem z nektaru. Zda-li má tento enzym nějaký vliv na dozrávání medu nebylo dosud objasněno [4].

3.11.4.4 Látky hormonálního charakteru a další specifické molekuly v medu

V medu jsou obsaženy hormony jako acetylcholin ($4,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu), adrenalin ($2 \text{ } \mu\text{g}$ volného a $2 - 6 \text{ } \mu\text{g}$ vázaného na 100 g medu), noradrenalin, dopamin [9, 5]. V medu bylo též identifikováno několik antibakteriálních a antifungálních faktorů včelího původu. Jedná se o látky citlivé na světlo, ale odolné vůči teplotě. Látky inhibují růst některých mikrobů, např.: *Bacillus subtilis*, *B. alvei*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*. Inhibiční účinek se liší podle druhu medu [4].

V medu jsou také zastoupeny lipidy v celkovém množství přibližně 0,015 % (z tohoto množství připadá 45 % esterům cholesterolu, 22 % triacylglycerolům, 18 % volným mastným kyselinám, 17 % volnému cholesterolu) [4].

3.11.5 Vitaminy v medu

Většina vitaminů v medu pochází z mateří kašičky a pylu. Nejvíce zastoupeny jsou vitaminy skupiny B, především thiamin, riboflavin, niacin, biotin a kyselina pantothenová; kyselina askorbová a tokoferol [9, 14]. Vitamíny rozpustné v tucích se v medu téměř

nevyskytují [5]. Kvůli nízkému množství je obsah vitamínů z hlediska výživy nepodstatný [4].

Tab. 6: Zastoupení některých vitamínů v medech [4]

Vitamíny	Průměrné množství ve 100 g medu [mg]
thiamin (B ₁)	0,004 - 0,006
riboflavin (B ₂)	0,02 - 0,06
niacin (B ₃)	0,11 - 0,36
pyridoxal (B ₆)	0,008 - 0,32
kyselina pantothenová (B ₅)	0,02 - 0,11
kyselina askorbová (C)	2,2 - 2,4

3.12 Antioxidanty v medu

3.12.1 Antioxidační vitamíny a provitamíny

Vitamíny jsou nízkomolekulární organické sloučeniny. Autotrofní mikroorganizmy si potřebné vitamíny syntetizují samy. Heterotrofní organizmy je syntetizují jen v omezené míře, získávají je především z potravy jako exogenní látky, některé vznikají prostřednictvím střevní, tedy intestinální mikroflóry [15].

Podle společných fyzikálních vlastností, rozpustnosti ve vodě (polární prostředí) a v tucích (nepolární prostředí), dělíme vitamíny na dvě základní skupiny [15]:

- vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní vitamíny) - B-komplex, vit. C, biotin
- vitamíny rozpustné v tucích (lipofilní vitamíny) – A, D, E, K

Látky, ze kterých organismus dovede syntetizovat vitamíny se nazývají provitamíny. Existují také látky, které biologické účinky vitamínů snižují, tyto se nazývají antivitamíny [15].

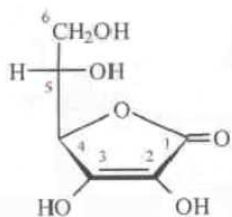
Hydrofilní vitamíny nejsou v organismu skladovány, popřípadě jen omezeně a jejich nadbytek je vylučován močí. Lipofilní vitamíny jsou skladovány v játrech; tzv. rezervní kapacita je doba, po kterou dokáže organismus krýt potřebu vitamínu z vlastních zásob. Potřeba vitamínů je poměrně nízká, individuální potřeba však závisí na stáří, zdravotním stavu, pohlaví, pracovní aktivitě, stravovacích návycích, životním stylu apod. V potravinách se vyskytují v množství od $\mu\text{g.kg}^{-1}$ až po stovky a tisíce mg.kg^{-1} [15].

V potravinářském průmyslu se vitamíny používají k doplnění jejich původního obsahu v potravíně (restituce) nebo také k obohacení na koncentrace vyšší než byly původní (fortifikace). Dále se uplatňují jako přirozená barviva (riboflavin, provitamíny A) a antioxidanty (vit. C, E, β -karoten) [15].

Jak již bylo zmíněno výše, v medu se vyskytují zejména vitamíny rozpustné ve vodě a některé provitamíny.

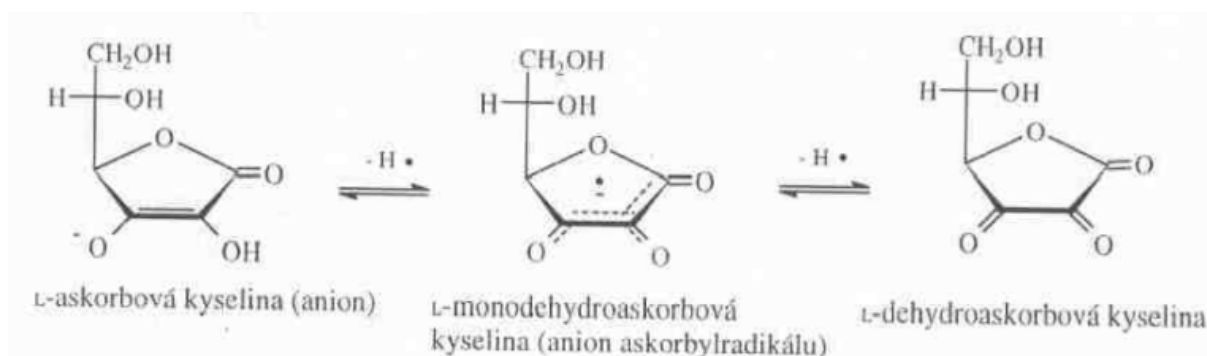
3.12.2 Vitamin C

Vitamin C se do medu přidává jako stabilizační aenos, poněvadž patří k nejsilnějším přírodním antioxidačním systémům. Biologicky aktivní sloučeninou vitamínu C je kyselina askorbová. Může existovat ve čtyřech formách stereoizomerů (C4 a C5 jsou asymetrické uhlíky), aktivitu vitamínu C představuje pouze kyselina L-askorbová (γ -lakton L-threo-hex-2-enonové kyseliny) [15].



Obr. 6: L-askorbová kyselina [15].

Názvem vitamin C se označuje také celý reverzibilní redoxní systém kyseliny L-askorbové, produkt její jednoelektronové oxidace (L-askorbylradikál) a produkt dvouelektronové oxidace (L-dehydroaskorbová kyselina) [15].



Obr. 7: Biologicky aktivní formy vitaminu C [15].

Vitamin C se podílí především na významných hydroxylačních reakcích probíhajících v organismu, je součástí biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, podílí se na absorpci iontových forem železa, jeho transportu, ovlivňuje transport sodných, chloridových a pravděpodobně i vápenatých iontů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu a v řadě dalších reakcí [15].

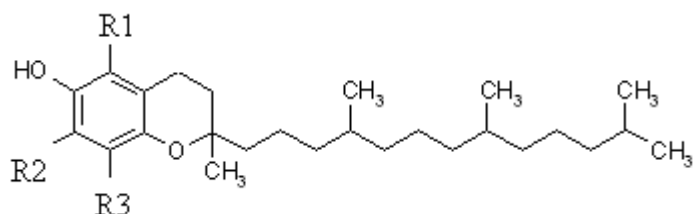
Z hlediska antioxidačních vlastností vitaminu C jsou důležité reakce s aktivními formami kyslíku, resp. s volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitaminu E, které zajišťují ochranu vitaminu E a lipidů membrán před oxidací. Nachází-li se kyselina askorbová v kombinaci s tokoferoly stává se silnějším antioxidantem. Kyselina také reaguje s toxickými formami kyslíku, a to s hydroxylovým radikálem $\text{HO}\bullet$, anionem superoxidového radikálu $\text{O}_2^{\bullet-}$ nebo singletovým kyslíkem $^1\text{O}_2$. Kyselina askorbová dále reaguje s kovy, jako např. se železem a měďí. Komplex s železitými ionty Fe^{3+} a kyslíkem se uplatňuje při autooxidaci vitaminu C [15]. Vitamin C dále zajišťuje ochranu labilním formám kyseliny listové, inhibuje tvorbu nitrosaminů a potlačuje tak mutagenní a karcinogenní účinky těchto sloučenin [15].

Kyselina askorbová se používá v potravinářství jako aditivum v konzervářské a kvasné technologii, v technologii masa, tuků, cereálií. Jako antioxidant se používá také sodná sůl kyseliny askorbové a v tukrozpustná 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina, která inhibuje tvorbu nitrosaminů v nakládaném masu a masných výrobcích. Obě tyto sloučeniny jsou plně aktivní formou vitaminu C [15].

3.12.3 Vitamin E

Vitamin E je jeden z mála lipofilních vitaminů vyskytující se v medu. Aktivitu vitaminu E vykazují osm strukturně příbuzných derivátů chromanu. Strukturním základem pro všech osm

sloučenin je tokol a tokotrienol, které obsahují chromanový cyklus s nasyceným nebo nenasyceným postranním řetězcem se 16 atomy uhlíku. Čtyři formy vitamínu E s nasyceným terpenoidním postranním řetězcem odvozeným od tokolu se nazývají tokoferoly, čtyři formy s nenasyceným postranním řetězcem odvozeným od tokotrienolu se nazývají tokotrienoly [15].



Obr. 8: *Formy vitamínu E odvozeny od tokoferolu.*

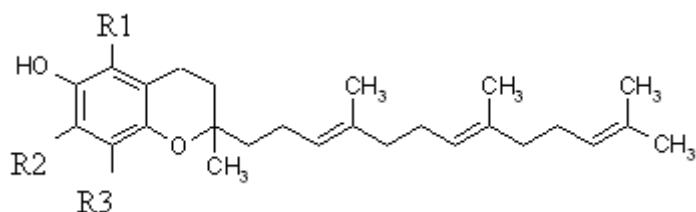
R1 = R2 = R3 = CH₃, 5,7,8-trimethyltokol, α-tokoferol

R1 = R3 = CH₃, R2 = H, 5,8-dimethyltokol, β-tokoferol

R1 = H, R2 = R3 = CH₃, 7,8-dimethyltokol, γ-tokoferol

R1 = R2 = H, R3 = CH₃, 8-methyltokol, δ-tokoferol

R1 = R2 = R3 = H, tokol [15].



Obr. 9: *Formy vitamínu E odvozeny od tokotrienolu*

R1 = R2 = R3 = CH₃, 5,7,8-trimethyltokotrienol, α-tokotrienol

R1 = R3 = CH₃, R2 = H, 5,8,-dimethyltokotrienol, β-tokotrienol

R1 = H, R2 = R3 = CH₃, 7,8-dimethyltokotrienol, γ-tokotrienol

R1 = R2 = H, R3 = CH₃, 8-tokotrienol, δ-tokotrienol [15].

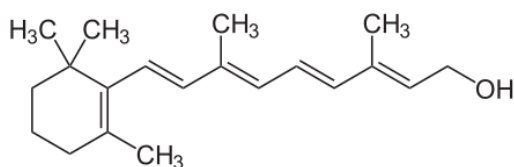
Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se od sebe liší polohou a počtem methylenových skupin v chromanovém cyklu, odlišují se také biologickou aktivitou [15].

Vitamín E, který je z více než 90 % tvořen α-tokoferolem, se jako nejvýznamnější lipofilní antioxidant uplatňuje u eukaryotických buněk jako ochrana nenasycených lipidů před poškozením volnými radikály. S β-karotenem a koenzymy Q chrání strukturu a neporušenost biomembrán, tzn. buněčné, cytoplasmové membrány (tzv. plasmolemy) a také membrán vnitrobuněčných organel, tzn. buněčné jádro, mitochondrie, lysosomy, endoplazmatické retikulum. Vitamín E se dále podílí na ochraně lipoproteinů přítomných v plazmě [15]. Tokoferoly reagují s volnými radikály a také s aktivními formami kyslíku. S hydroperoxylovými radikály lipidů R-O-O• reagují za vzniku hydroperoxidů R-O-OH a radikálů tokoferolů a dojde tak k přerušení řetězové radikálové autooxidační reakce v její propagační fázi. Singletový kyslík tokoferoly buď zhasí nebo s ním reagují za vzniku různých oxidačních produktů. Jak již bylo uvedeno výše, samotný vitamín E je před oxidací chráněn kyselinou askorbovou [15].

Denní potřeba vitamínu není dodnes přesně stanovena. Odvíjí se od příjmu polyenových mastných kyselin potravou. Při průměrném denním příjmu mastných kyselin 14-19 g je doporučován denní příjem 15 mg vitamínu E a na další 1 g mastných kyselin 0,5-0,6 mg vitamínu [15]. Denní potřebu vitamínu pokrývají především rostlinné lipidy, hlavně oleje a margaríny. Významným zdrojem jsou i další potraviny rostlinného či živočišného původu, které sice neobsahují velké množství vitamínu, ale jsou konzumovány ve velkém množství a poměrně pravidelně, například maso, ovoce, zelenina [15].

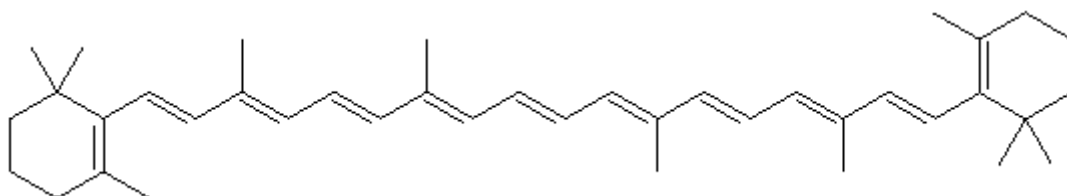
3.12.4 Vitamin A a karotenoidy

Vitamin A se v medu nevyskytuje, jde výhradně o živočišný vitamin. V medu je však přítomen provitamin A ve formě karotenoidů. Nejvýznamnější sloučeninou vykazující aktivitu vitamínu A je retinol (all-*trans*-retinol). Jedná se o izoprenoid s pěti konjugovanými dvojnými vazbami v molekule [15].

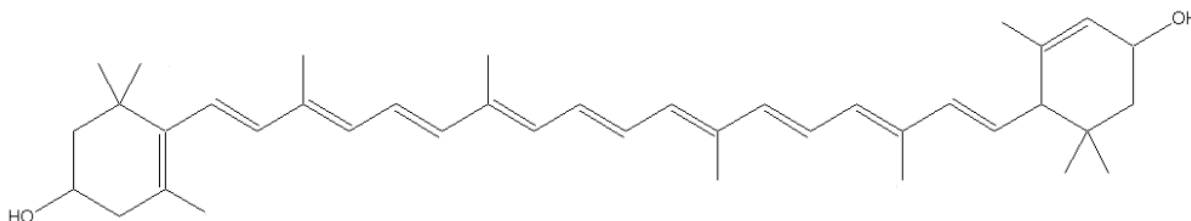


Obr. 10: Struktura all-*trans*-retinolu [15].

Aktivitu provitamínu A vykazují asi 50 sloučenin ze skupiny karotenoidů, které musí ve struktuře obsahovat beta-iononový kruh. Nejvýznamnější provitamin A je β -karoten často doprovázen α -karotenem [15].



Obr. 11: Struktura β -karotenu [15]



Obr. 12: Struktura luteinu [16]

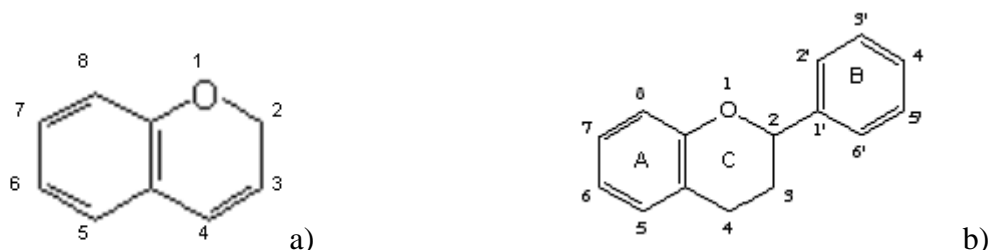
Retinol se uplatňuje především v reakcích zrakového vjemu a při biosyntéze bílkovin, tzn. růstu buněk. Biologicky aktivní formy vitamínu jsou skladovány v játrech [15].

Doporučená denní dávka retinolu se pohybuje v rozmezí 0,4-2,0 mg na den v závislosti na fyziologickém stavu jedince. Denní potřeba vitamínu je plně kryta potravou, přičemž podíl rostlinné a živočišné stravy je rovnocenný. Antivitaminem A jsou lipoxygenázy a lipoxidázy.

Provitaminy A jsou součástí kontrolních mechanismů likvidujících volné kyslíkové radikály, vykazují tedy antikarcinogenní účinky [15]. Reagují s volnými radikály a působí tedy jako antioxidanty. Hydroperoxylový radikál $R-O-O\bullet$ vznikající při autooxidaci lipidů je zachycen konjugovaným systémem dvojných vazeb za vzniku relativně stabilního radikálu β -karotenu. Karotenoidy vykazují vyšší antioxidační účinky v přítomnosti malého množství kyslíku. β -karoten reaguje také s alkoxylovým radikálem $R-O\bullet$. Dále β -karoten zhasí singletový kyslík (1O_2). Před oxidací chrání β -karoten opět tokoferoly [15].

3.13 Flavonoidy

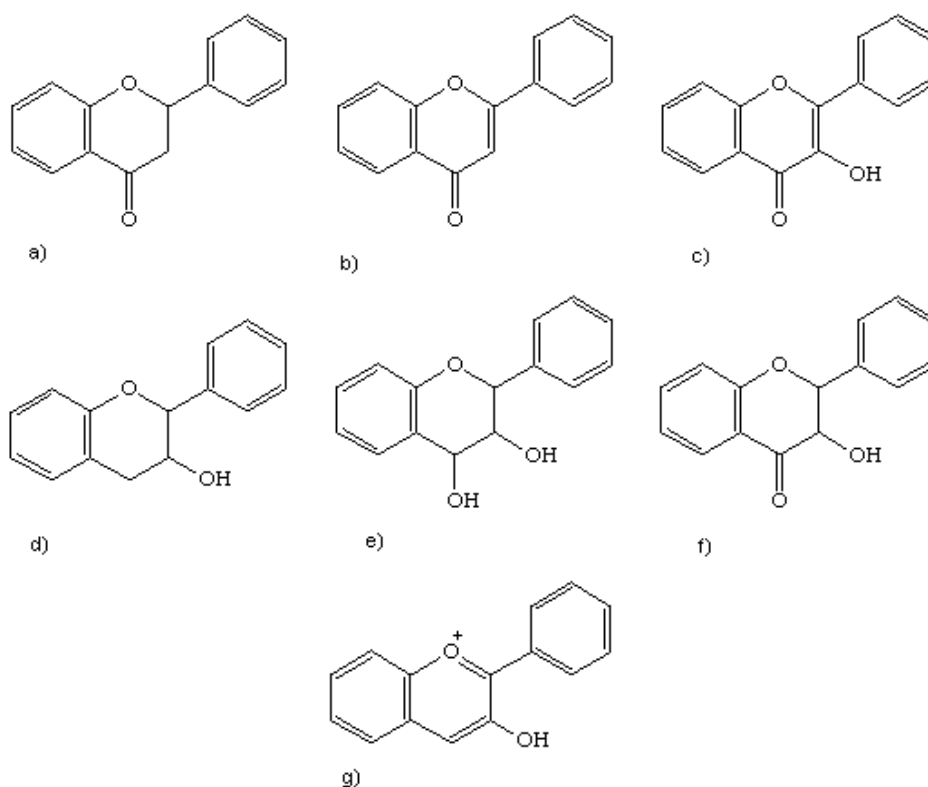
Flavononoidy představují širokou skupinu rostlinných fenolů a jsou poměrně široce zastoupeny i v medu. V přírodě je dosud známo na 4000 těchto sloučenin a tento počet není zdaleka konečný [16]. Flavonoidy v molekule obsahují dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Jedná se o uspořádání $C_6-C_3-C_6$, přičemž C_3 řetězec je obvykle součástí heterocyklického pyranového kruhu. Flavonoidy jsou tedy odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2H-chromenu, v poloze C2 substituovaného fenylovou skupinou, který se nazývá flavan [16].



Obr. 13: Struktura a) 2H-chromenu, b) flavanu [16]

Všechny tři kruhy bývají substituovány hydroxy- nebo methoxyskupinami, jednotlivé deriváty se pak liší stupněm substituce a oxidace. Flavonoidy se vyskytují jako volné látky, častěji jako glykosidy.

Základní struktura flavonoidů se rozlišuje podle stupně oxidace C_3 řetězce [16] na katechiny (flavan-3-oly), leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly), flavanony, flavanonoly, flakony, flavonoly a anthokyanidiny (obr. 21), dále na strukturně příbuzné nebo odvozené chalkony, dihydrochalkony a Aurory. Méně časté jsou sloučeniny, které mají spojení s pyranovým kruhem v poloze C_3 – isoflavonoidy a sloučeniny se spojením v poloze C_4 – neoflavonoidy.

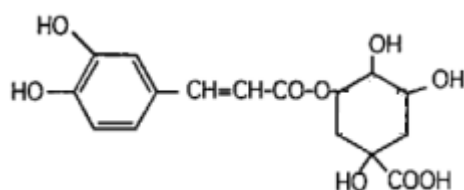


Obr. 14: Obecná struktura flavonoidních látek: a) flavanony, b) flavony, c) flavonoly, d) katechiny, e) leukoanthokyanidiny, f) flavanonoly, g) anthokyanidiny [16]

Příprava potravin a zpracování čerstvého ovoce a zeleniny může obsah flavonoidů snížit až o 50 % v důsledku vyluhování do vody nebo odstraněním částí bohatých na tyto látky. Obilniny a olejnatá semena obsahují flavonoidy, ale zpracováním o ně přicházejí. Ostatní potraviny rostlinného původu se v obsahu flavonoidů liší. Med, čokoláda a sladkosti, které obsahují některé rostlinné části, flavonoidy obsahují. V živočišné stravě se flavonoidy téměř nenacházejí [17]. Doporučený denní příjem v potravě se pohybuje od 23 mg/den do 1000 mg/den, ale hodnoty pro jednotlivé látky nebo třídy se mohou lišit a v současné době nejsou hodnoty přesně stanoveny [17].

Studie in vitro a na zvířatech prokázaly antioxidační a antimutagenní aktivitu flavonoidních látek. Flavonoidy mohou snižovat riziko výskytu kardiovaskulárních chorob a mrtvice. Třídy flavonoidů se liší svou absorpcí a jejich metabolismus není dosud spolehlivě prostudován. Střevní bakterie štěpí heterocyklický kruh a degradují flavonoidy na fenylové kyseliny, které mohou být absorbovány, konjugovány, vyloučeny nebo dále zpracovávány střevními bakteriemi [17].

Flavonoidy se uplatňují jako přírodní rostlinná barviva, některé jsou důležité pro svou hořkou či trpkou chuť, jiné mají významné biologické účinky [17]. Například kyselina chlorogenová, která se ve významném množství vyskytuje v bramborech, kávě apod. se uplatňuje jako substrát oxidoreduktáz v reakcích enzymatického hnědnutí.



Obr. 15: Struktura kyseliny chlorogenové [16]

Rutin (dříve nazýván vitamin P) vykazuje antioxidační vlastnosti, má vliv na pružnost a permeabilitu krevních kapilár. Používá se ve farmacii a v potravinových doplncích. Rutin spolu s dalšími flavonoidními látkami zvyšuje hladinu kyseliny askorbové v různých živočišných orgánech tak, že ji chrání před oxidací katalyzovanou ionty kovů nebo zvyšuje její využitelnost v organismu. Přirozené zdroje kyseliny askorbové obsahující flavonoidy (například šípky) jsou proto účinnější než syntetický vitamin C [17].

Tab. 7: Některé flavonoidy obsažené v potravinách [18]

Podtřída flavonoidů	Flavonoidy	Potraviny, v nichž se vyskytují
Anthokyanidiny	kyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin.	červené, modré a nachové plody, resp. bobule, červené a fialové hroznové víno, červené víno.
Flavanoly	katechiny (monomery)- katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin gallát, epigallokatechin gallát	čaj (především zelený a bílý), čokoláda, hroznové víno, bobule, jablka
	dimery a polymery - theaflavin, thearubigin, proanthokyanidin	theaflavin a thearubigin - čaj (především černý a oolong) proanthokyanidin - čokoláda, jablka, bobule, červené hroznové víno, červené víno
Flavanony	hesperetin, naringenin, eriodictyol	citrusové ovoce a šťávy, hlavně pomeranč, grep, citron
Flavanoly	kvercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin	žluté cibule, šalotky, kapusta, brokolice, jablka, bobule, čaje
Flavony	apigenin, luteolin	petržel, tymián, celer, papriky
Isoflavony	daidzein, genistein, glycitein	sojová zrna, sojová jídla, luštěniny

3.13.1 Antioxidační účinky flavonoidů

Flavonoidy jsou sloučeniny se zdraví prospěšnými biochemickými a antioxidačními účinky. Jejich výživový příjem je srovnatelný s přínosem jiných antioxidantů, jakými jsou například vitamín C a E [19].

Schopnost flavonoidů působit jako antioxidanty závisí na jejich molekulové struktuře. Poloha hydroxylové skupiny a jejich dalších posunů je v chemické struktuře flavonoidů velmi důležitá pro jejich antioxidační aktivitu a schopnost vylučovat volné radikály. Kvercetin, nejčastěji se vyskytující flavonol, je silný antioxidant, protože má všechny strukturní předpoklady pro vylučování volných radikálů [19].

Antioxidanty jsou sloučeniny, které chrání buňku proti škodlivým vlivům volných kyslíkových radikálů, jako je singletový kyslík, superoxid, peroxylový radikál, hydroxylový radikál. Při nerovnováze mezi antioxidanty a volnými kyslíkovými radikály dochází k oxidačnímu stresu, který vede k poškození buněk. Oxidační stres je dáván do souvislosti se vznikem rakoviny, s rychlejším stárnutím, vznikem aterosklerózy, ischemickými chorobami, zánětlivými a neurodegenerativními nemocemi (Parkinsonova a Alzheimerova choroba). Flavonoidy pomáhají v boji proti těmto nemocem a spolu s vitamíny s antioxidačním účinkem a s enzymy přispívají k celkovému antioxidačnímu obrannému systému lidského těla. Epidemiologické studie ukázaly, že příjem flavonoidů nepřímo souvisí s úmrtností na koronární a srdeční onemocnění a s výskytem srdečních příhod [19].

Příspěvek flavonoidů k antioxidačnímu obrannému systému může být značný vzhledem k celkovému dennímu příjmu flavonoidů, který se pohybuje v rozsahu 50 – 800 mg. Tento příjem je vysoký ve srovnání s průměrným příjmem ostatních potravinových antioxidantů jako jsou vitamin C (70 mg), vitamin E (7 – 70 mg) nebo karotenoidy (2 – 3 mg). Příjem flavonoidů závisí na spotřebě ovoce, zeleniny a některých nápojů jako jsou červené víno, čaj nebo pivo. Vysoký příjem čaje a vína může mít značný vliv na celkový přísun flavonoidů u některých skupin obyvatelstva [19].

3.13.2 Nežádoucí látky v medu

3.13.2.1 Toxiny

Med nemusí být jen zdraví prospěšný. Jedovaté medy jsou známy již od starověku, kdy Xenophon (450 - 353 př.n.l.) popisuje v jednom ze svých děl hromadnou otravu Řecké vojenské výpravy pontským medem z *Rhododendron flavum* a *R. ponticum* [4, 5]. I v dnešní době jsou hlášeny otravy způsobené medem, a to především z oblastí USA, Ruska, Japonska, Kavkazu a Malé Asie [4].

Toxické medy vznikají z rostlin čeledi *Ericaceae*, hlavně rodů *Rhododendron* a *Azalea*, z rostlin čeledi *Euphorbiaceae*, a také z rulíku zlomocného (*Atropa bella-donna*). Jedovatá je také medová rosa, kterou včely sbírají a která je vylučována cikádami [4, 5]. Toxické látky, které medy z těchto rostlin obsahují, jsou andromedotoxin a andromedol. V medovicovém medu z Nového Zélandu byl zjištěn obsah jedovatého picrotoxinu a mellitoxinu. V medech z ČR nebyla zjištěna žádná pro člověka jedovatá látka. [5]. Rhododendrony obsahují také gyanotoxiny I, II, III a tetracyklické diterpeny, které jsou v medicíně užívány jako antihypertonika (léky proti vysokému tlaku) [4]. Jedovaté medy původem z rostliny *Coriaria arborea* obsahují jedovaté látky tutin a hyenanchin [4].



Obr. 16: *Coriaria arborea* [20]

V medu se mohou vyskytovat i chemické látky pocházející ze znečištěného životního prostředí a pesticidy, které jsou v současné době v zemědělské prvovýrobě hojně používány [9].

3.13.2.2 *Hydroxymethylfurfural*

Hydroxymethylfurfural (HMF, 5-hydroxymethyl-2-furancarbaldehyd) je v čistém stavu bezbarvá velmi reaktivní látka, která na vzduchu rychle hnědne. S ostatními složkami medu reaguje za vzniku žlutohnědých barviv. Reaktivními místy HMF jsou dvojné vazby vzniklé po ztrátě vody z molekuly fruktózy. HMF patří mezi hlavní ukazatele jakosti medu. Obsah této látky je dán jako parametr v národní i mezinárodní legislativě [4]. Vzniká během kyselé dehydratace hexóz, především monosacharidů glukózy a fruktózy. V čerstvém medu se HMF téměř nevyskytuje, jeho obsah se zvyšuje s rostoucí dobou skladování. Koncentrace závisí také na pH a teplotě a tedy i na případném zahřátí medu.

HMF je ukazatelem čerstvosti, ale odhalí také případné nevhodné zacházení při zpracování, skladování a distribuci [4]. K výraznému nárůstu koncentrace HMF v medech dochází při teplotách nad 60 °C. Naopak při skladování při teplotě pod 10 °C nedochází téměř k žádnému nárůstu koncentrace HMF nejméně po dobu jednoho roku [5]. Nárůst koncentrace HMF může být dále způsoben i přidavkem invertního cukru [4].

Zahřátí medu nezpůsobí jen vznik HMF, ale dojde ke znehodnocení i celé řady látek přispívajících k biologickým účinkům medu jako jsou např. enzymy. HMF není pro člověka toxický, je považován „jen“ za antinutrient [5].

3.14 Mikrobiologický profil medu

Konzistence a složení medu tvoří nevhodné podmínky pro růst a přežívání mikroorganismů. Vysoký osmotický tlak, nízké pH, vyšší koncentrace organických kyselin, přítomnost některých enzymů, peroxidu vodíku, redukujících sacharidů a dalších sloučenin tuto skutečnost jen umocňují [5].

Faktorem, který mikrobiologické znehodnocení medu naopak silně podporuje, je aktivita vody. Nejčastější nežádoucí mikroflóra představují osmofilní kvasinky, např. *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces mellis*, *Torulopsis apicola* [4].

Na povrchu medu žijí kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*, ke své existenci potřebují kyslík. V celém objemu se vyskytují kvasinky rodu *Torula* a *Torulopsis* [5].

Hygroskopicitu a viskozitu medu vytvářejí ložiska, kde se vyskytuje vysoká aktivita vody a ta umožňuje růst mikroorganismů. Pokud stoupne aktivita vody nad 20 %, dochází také k jejich množení a postupnému zkvašování medu [4].

Pokud při stáčení medu nejsou dodrženy základní hygienické požadavky, mohou se v medech vyskytnout také další nežádoucí mikroorganismy, např.: koliformní bakterie. Jejich razantnějšímu pomnožení však většinou zabrání antimikrobiální látky přírodního původu obsažené v medu [4]. V ojedinělých případech se v medech mohou vyskytnout patogenní bakterie. K těm nejzávažnějším patří *Clostridium botulinum*. Med obsahující spory klostridií může u dětí po požití vyvolat botulismus. Jsou-li v medu obsaženy spory (toxin botulotoxin se v medu nevyskytuje), po požití kontaminovaného medu dochází k onemocnění tak, že spory vyklíčí ve střevech, začnou se zde množit a produkovat nebezpečný toxin. V Evropě se

onemocnění vyskytuje jen velmi zřídka, v USA je výskyt častější, obsah spor se zde pohybuje v mezích 1 - 10 spor.kg⁻¹ medu [4].

Dalšími mikroorganismy vyskytujícími se v medu mohou být i organismy způsobující choroby včel [5]. Mikroorganismy se dostávají do medu:

- a) primárně - včely - pyl, trávicí trakt, prach, vzduch,
- b) sekundárně - při medobraní z nečistých nádob,
- c) terciárně - při následném zpracování medu (plnění, pastování).

Požadavky na mikrobiální profil medu stanovuje Vyhláška č. 294/1997 Sb. o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení, ve znění pozdějších předpisů [4].

3.14.1.1.1 Stanovení osmofilních kvasinek

Pro toto stanovení dosud neexistuje jednotná ISO (EN) norma.

3.14.1.1.2 Stanovení koliformních bakterií

Stanovení se provádí dle ČSN ISO 4832 (560085) Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií (březen 1995).

3.14.1.1.3 Stanovení *Cl. botulinum* a botulotoxinu

Stanovení se řídí dle ČSN 560090 Potravinářské výroby. Průkaz botulinických toxinů a *Clostridium botulinum* (1985).

3.15 Krystalizace medu

Krystalizace medu patří mezi jeho základní vlastnosti. Ke krystalizaci dochází, klesne-li teplota skladování na teplotu nižší než je v úlu (tj. pod 30 °C). V závislosti na původu medu může ke krystalizaci dojít během dne, měsíce i několika let. Dalšími faktory ovlivňujícími tento proces jsou klimatické podmínky, způsob získávání medu; velmi záleží na chemickém složení, především na poměru fruktózy k jiným cukrům, poměru cukrů k necukrům a k minerálním látkám, obsahu koloidů a obsahu vody.

Důležitou roli v procesu krystalizace hraje obsah glukózy. Během krystalizace dochází k vypadávání větších či menších krystalů glukózy, čímž se snižuje homogennost medu. Konzistence medu se může změnit na vločkovitou či pastovitou (řepkový med), jemnozrnnou (jetelový, vojtěškový, lipový med), hrubozrnnou (pohankový, kaštanový, jedlový, modřínový). Opačný efekt na krystalizaci medu má obsah fruktózy a její poměr k ostatním cukrům. Při stejném obsahu vody, převládá-li obsah fruktózy nad glukózou, zůstává med tekutý po delší dobu a ke krystalizaci dochází později. Medy s vyšším obsahem glukózy mají tedy větší sklon ke krystalizaci [4].

Při vypadávání krystalků glukózy se fruktóza rovnoměrně rozděluje právě mezi tyto krystalky. Prevládá-li však fruktóza nad glukózou, nemůže se fruktóza včetně tekutého podílu vmezeřit mezi krystalky glukózy. Dochází tedy k deshomenizaci. Krystalky glukózy vytvoří sedlinu, supernatant obsahuje fruktózou. V tomto případě se dosáhne homogenizace zahřátím, je však potřeba použít nižší teplotu, aby tepelným záhřevem nedošlo k poškození specifických biologických vlastností medu [4].

Nesacharidové sloučeniny snižují koncentraci cukrů a tím také sklon ke krystalizaci. Koloidní látky se hromadí na povrchu medu a takto med zředí, jejich účinek je tedy pouze mechanický. Dále koloidy tvoří s cukry komplexy, které zvyšují stabilitu roztoků [4].

Rychlost krystalizace je také ovlivněna tvorbou krystalických jader. Ty vznikají především při teplotě 5 - 7 °C. Na krystalizačních jádrech se tvarují krystalky způsobující krystalizaci [4]. Zabránit tvorbě krystalků je možné odstraněním jemných částeczek pylu, vosku, prachu, které mohou působit právě jako krystalizační jádra. Jestliže nebyl med předem zahřát, samotná krystalizace probíhá nejrychleji při teplotě 15 °C [4].



Obr. 17: Květový med (šlehaný) se znatelným oddělením glukózové (dolní) a fruktóзовé (horní) vrstvy. Bílá barva spodní vrstvy je způsobena bílou barvou krystalků glukózy.

3.16 Využití medu

Pro své složení a příznivé účinky na lidský organismus je med vhodnou potravinou určenou jak k přímé spotřebě, tak k přidávání do jiných potravin, nealkoholických či alkoholických nápojů. Je to vhodná potravina nebo doplněk stravy nejen lidí, ale také zvířat [4]. Pro diabetiky je med a potraviny jím slazené vhodnější než potraviny obsahující „běžný“ cukr [5].

Med je využíván i ve farmacii a kosmetickém průmyslu. Pro jeho antibakteriální účinky se dnes zvažuje i jeho použití v medicíně, např. k léčení vředů a jiných povrchových infekcí, popálenin a ran [4]. Konzumace medu zlepšuje fyzickou kondici, brání vzniku nadměrné únavy během jednorázových zátěží, je vhodným prostředkem k regeneraci sil po silné fyzické námaze, pomáhá při řešení zažívacích potíží jako je zácpa či vředové choroby, dokáže chránit stěny žaludku a střev před žaludečními šťávami [5].

Med je vhodné užívat při onemocnění ledvin, neobsahuje totiž téměř žádné bílkoviny nezátěžuje tedy ledviny, má dostatek energie a navíc obsahuje různé biologicky účinné látky. Dále med příznivě působí na fixaci vápníku v kostech a při chudokrevnosti [5].

Díky jeho antibakteriálním účinkům je vhodné jej užívat v době nachlazení či zánětu horních cest dýchacích [5]. Antibakteriální účinky jsou u různých medů různé. Nevhodným skladováním nebo ošetřením mohou být snadno zničeny. Nejdůležitějším faktorem antibakteriální aktivity je množství peroxidu vodíku H_2O_2 , u některých medů jsou to navíc další neperoxidové faktory. Oba tyto faktory závisí na botanickém původu medu [4].

Med prokazuje také hojivé účinky, nejlépe při aplikaci přímo do rány při odřeninách nebo dokonce popáleninách. Vysoká koncentrace sacharidů v medu vytváří vysoký osmotický tlak, který vede ke zvýšenému průtoku krve a lymfy. V místě poranění dochází ke zvýšení koncentrace obranných látek, což vede k vyloučení nečistot, mikroorganismů a buněčné drti. Přítomnost medu podpoří granulaci, tkáň jizvy se postupně stává pružnější a lépe prokrvovanou [4]. Kromě rychlého hojení dochází i k minimalizaci puchýřků a jizev [5].

Med je součástí také apireflexní terapie. Jedná se o kombinaci apiterapie (tj. léčení pomocí včelích produktů) a reflexní terapie (použití tlaku na biologicky účinných místech lidského těla). Včelí produkty se jako malé kuličky vpravují mechanicky do těla v oněch biologických bodech a upevňují se náplastí [4]. V dnešní uspěchané době nelze zanedbat ani protistresový účinek medu. Organismus ve stresu přijímá velké množství sacharidů, které potřebuje pro svůj metabolismus thiamin (vitamin B_1). Tělní zásoby thiaminu jsou velmi malé. Med obsahuje thiamin v takovém množství, aby se cukr využil beze ztrát. V medu je navíc obsažen mangan, který účinek thiaminu posiluje.

Med také podporuje správnou funkci jater. Při stresu se snižují zásoby glykogenu v játrech. Med je schopen tyto rezervy velmi rychle obnovit, využívá se především obsažená fruktóza. V medu je navíc obsažen cholin, který regulací metabolismu tuků v játrech zabraňuje jejich ztučnění. Acetylcholin navíc způsobuje vazokonstrikci (zúžení cév) a dochází tak ke snížení krevního tlaku a zároveň se zesiluje účinek hořčiku a draslíku [4].

Výhodou konzumace samotné je skutečnost, že med nemá kariogenní účinky, tzn. nezpůsobuje zubní kaz. Naopak obsahuje řadu látek, které brání vzniku zubního kazu [5]. Přítomná glukooxidáza přeměňuje glukózu na glukonolakton, hydrolýzou se štěpí na kyselinu glukonovou a H_2O_2 , který má baktericidní účinek na kariogenní bakterie. Dalším účinným faktorem je nízké pH medu, které je nepříznivé pro růst a množení bakterií a hub vyskytujících se v dutině ústní, a které potřebují pH spíše neutrální [4].

Významný je obsah vápníku a fosforu, tyto prvky jsou potřeba při metabolismu sacharózy a organismus si je může vzít přímo z medu a nemusí čerpat například ze zubní skloviny [5].

Jediným zásadním problémem medu a včelích produktů vůbec je možnost vyvolání alergických reakcí [5].

3.17 Studium antimutagenních/genotoxických vlastností

V minulých několika letech bylo prokázáno, že řada faktorů, se kterými je člověk v denním kontaktu a které dříve byly považovány za bezpečné, může i po delší době působení v malých dávkách vyvolat poškození zdraví. Za nejzávažnější účinek takovýchto faktorů je považována schopnost působit na genetický materiál živých organismů, tzv. genotoxický účinek. Studium genotoxických účinků se zabývá genetická toxikologie. Ta analyzuje pozdní důsledky poškození DNA chemickými, biologickými i fyzikálními mutageny, na rozdíl od klasické toxikologie, která analyzuje akutní poškození organismu [1].

Postup hodnocení genetického rizika se skládá z pěti základních kroků [1]:

- detekce mutagenní aktivity
- studium metabolismu látky člověkem
- stanovení množství látky, která působí na jednotlivce a na celou populaci
- riziko vystavení testované látce
- nejvyšší přípustná úroveň genetického poškození.

3.17.1 Mutagen

Mutageny jsou látky schopné vyvolávat mutace. Dělíme je na [21]:

- fyzikální: a) UV záření - zdrojem je Slunce, pro jednobuněčné představuje silný mutagen, u mnohobuněčných poškozuje buňky na povrchu organismu.
b) ionizující záření - radioaktivní nebo RTG záření, vyvolává chromozomové i genomové mutace.
- chemické - kyselina dusitá a dusitany, PAU, PCB, bojové látky, některá léčiva, barviva, některé látky jako součásti plastů, hnojiv, pesticidů, apod.
- biologické - některé viry, jako retroviry, herpetické viry [21], poruchy reparačních mechanismů [22]

3.17.2 Mutace

Mutace jsou náhodné změny genetické informace organismu. Schopnost vyvolávat mutace se označuje jako mutagenita nebo také genotoxicita [21]. Organismus, u kterého proběhla mutace, je nazýván mutant, proces vzniku mutace je mutageneze. Mutace jsou obvykle považovány za škodlivé a nežádoucí jevy způsobující vrozené vady nebo rakovinu, avšak mohou to být také prospěšné změny, zajišťující pestrost a také přizpůsobování se prostředí během evoluce [23].

Podle rozsahu změn je dělíme na [21]:

- genové - mohou ovlivnit jediný gen nebo několik genů
- chromozomové - ovlivňují část chromozomu, změny počtu nebo struktury
- genomové - ovlivňují celý genom.

Podle typu postižených buněk je dělíme na [22]:

- somatické - postihují pouze potomky mutované tělové buňky, nepřenáší se mezi jedinci
- gametické - mohou se přenést z rodičů na děti.

Mutace lze také rozdělit podle rozsahu poškození buňky či organismu [21]:

- vitální - buňka či organismus přežívá
- letální - mutace způsobuje usmrcení buňky, organismu.

Podle mechanismu vzniku mutace je dále můžeme rozdělit na [21]:

- spontánní - vznikají bez působení vnějších vlivů, např. při chybné replikaci, transkripci DNA. Buňky pomocí reparačních enzymů dokáží tyto mutace do jisté odstraňovat, jejich výskyt je tedy velmi nízký.
- indukované - vznikají jako důsledek působení vnějších mutagenních faktorů. Při laboratorních pokusech na modelových organizmech se mutace indukují uměle.

Proces mutace může být také podmíněn typem buňky, druhem a stářím organismu, jeho fyziologickým stavem apod. [1].

V organizmech probíhá řada procesů, které snižují počet nově vznikajících mutací. Mutace při replikaci vznikají poměrně často. DNA-polymeráza však kontroluje nově vzniklé vlákno

DNA a při objevení neshody v zařazení je chybná báze odstraněna a na její místo je zařazena správná. Poruchy tohoto opravného mechanismu a jemu podobných reparačních procesů mohou vést ke zvýšenému výskytu mutací, což v důsledku vede ke vzniku řady onemocnění a ke vzniku nádorů [22].

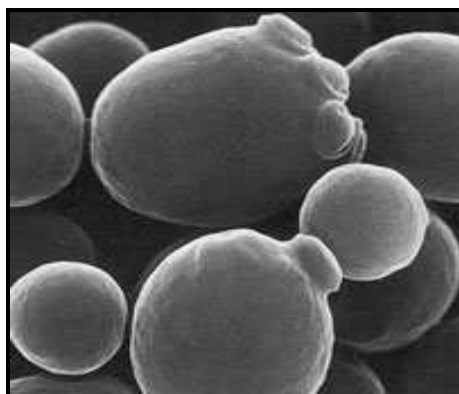
3.17.3 Metody testování antimutagenních a genotoxických účinků

Pro hodnocení antimutagenních a genotoxických účinků byla vyvinuta řada testů využívajících speciální detekční systémy. Podle doby potřebné ke stanovení a zhodnocení mutagenity dělíme metody na [1]:

- dlouhodobé testy na savcích - umožňují získat hlubší a ucelenější poznatky. Na základě příslušných výsledků je možno posuzovat míru genotoxického rizika pro člověka.
- krátkodobé testy na mikroorganismech (zejména bakteriích) - získané výsledky nelze přímo aplikovat na člověka (z důvodu odlišného enzymatického vybavení prokaryotních a eukaryotních organismů; mutagenní aktivita chemických látek s prokarcinogenním potenciálem se projeví až po aktivaci metabolismem v savčím organismu). Jejich výhodou je však rychlost, snadná proveditelnost, technická a materiálová nenáročnost.

3.17.3.1 Testování na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* D7

Buňky *Saccharomyces cerevisiae* mají kompletní eukaryotický buněčný cyklus a v závislosti na podmínkách mohou existovat v haploidním nebo diploidním stádiu. U testovacího kmene *Saccharomyces cerevisiae* D7 může být detekováno několik typů mutací [24].



Obr. 18: Morfologie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [25].

a) Mitotický crossing-over

Crossing-over (překřížení) je proces, při kterém dochází ke genetické rekombinaci. Část chromatidy je zaměněna odpovídající částí homologní chromatidy, tj. chromatidy ze stejného chromozomového páru. Tato mutace se u testovaného kmene *S. cerevisiae* D7 projeví červeným zbarvením kolonií, dochází k akumulaci červeného pigmentu v buňkách, kde nastala blokáde purinové syntézy. Buňky, u kterých k mutaci nedošlo, rostou na syntetickém médiu ve formě bílých kolonií s omezeným obsahem adeninu [26, 27].



Obr. 19: *Mutace typu mitotický crossing-over.*

b) Reverzní mutace

Reverzní (zpětné) mutace mohou mít dva typy mechanismů:

- reverze k původnímu volnému genotypu
- další mutace potlačující předešlou změnu

Detekce je založena na růstu zmutovaných buněk na syntetickém médiu bez přítomnosti izoleucinu [26, 27].



Obr. 20: *Reverzní mutace kvasinky Saccharomyces cerevisiae D7.*

c) Genová konverze

Detekce genové konverze je obdobná jako u reverzní mutace, sleduje se růst buněk na syntetickém médiu bez přítomnosti tryptofanu [26, 27].

U tohoto testovacího systému je možné využít také metabolické aktivace promutagenů jako u Amesova testu pomocí S9 frakce jaterního homogenátu, koenzymu NADPH a glukosa-6-fosfátu [26, 27].



Obr. 21: Genová konverze.

3.17.3.2 Testování na organismu *Euglena gracilis*

Euglena gracilis je jednobuněčný prvek obsahující multigenomický systém s jadernou, mitochondriální a chloroplastovou DNA. Detekční schopnost tohoto modelu je založena na selektivní citlivosti chloroplastového genomu ke xenobiotikům. To má za následek snížení funkčnosti chloroplastů v buňce. Tento jev je doprovázen snížením nebo úplnou ztrátou chloroplastové DNA. Aktivita mutagenů s protichloroplastovým účinkem se projeví tvorbou heterotrofních bezbarvých kolonií [26].

Model testu s použitím organismu *E. gracilis* je vhodný pro testování mutagenů i antimutagenů [26].

Účinnou látkou s antichloroplastovým efektem v buňkách *E. gracilis* je ofloxacin. Ofloxacin patří do skupiny fluorochinolonů. Fluorochinolony produkují superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), který způsobuje poškození chloroplastů prostřednictvím oxidačního stresu, vznikem nerovnováhy v elektronovém transportu. Genotoxický efekt těchto antimikrobiálních látek se uplatňuje vazbou na komplex DNA-gyrázy, jeho stabilizací a zamezením pohybu enzymu. Ofloxacin také způsobuje poškození mitochondrií, v tomto případě je však pouze krátkodobé [27].

Experimentální práci u kmene *Euglena gracilis* komplikují především značné růstové nároky a omezená schopnost růstu na syntetických médiích, především na agarových plotnách [24].



Obr. 22: Morfologie prvoka *Euglena gracilis* [28]

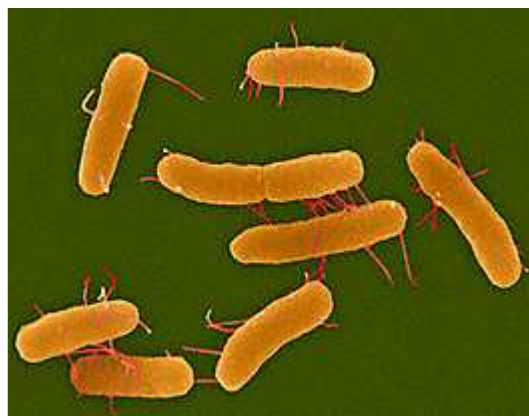
3.17.3.3 Amesův test

Amesův test je nejpropracovanějším a velmi často používaným systémem pro hodnocení mutagenní aktivity chemických látek. Metoda využívá mutantních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium* His⁻, které byly odvozeny od standardního kmene *Salmonella typhimurium* LT 2, testovací kmen se liší umístěním mutace v histidinovém operonu [1].

Metoda umožňuje detekci mutagenů, které indukují přímé nebo supresorové zpětné mutace - reverze. Ty se projeví návratem k prototrofii, v tomto případě to znamená ke schopnosti syntetizovat histidin [1].

Ke zvýšení citlivosti metodiky přispívají přídatné mutace, které byly vřazeny do genomu některých indikátorových kmenů. První z nich, *uvrB* delece, eliminuje excizní reparační systém, což pak umožňuje detekci i takových poškození DNA, která by byla tímto systémem opravena. Další přídatné mutace *rfa* a *gal* vedou k potlačení syntézy postranního polysacharidového řetězce lipopolysacharidové membrány. Narušení struktury buněčné membrány se projeví zvýšením její propustnosti pro mnohé testované látky. Kmeny s *rfa* mutací umožňují testy s metabolickou aktivací *in vitro*, kde zvýšená permeabilita buněčné membrány usnadňuje průnik S9 frakce do bakteriální buňky [1].

Výhodou *Salmonella typhimurium* His⁻ detekčního systému je, že paralelní aplikací několika různých specifických indikátorových kmenů je možné s poměrně vysokou přesností stanovit, jaký typ genových mutací testovaná látka vyvolává [1].



Obr. 23: Morfologie bakterie *Salmonella typhimurium* [29]

3.17.3.4 *Další testy genotoxicity*

SOS Chromotest

SOS chromotest je univerzální bakteriální detekční systém umožňující hodnotit mutagenitu chemických látek vyvolávajících taková poškození nebo inhibici replikace DNA, která v buňkách indukují SOS reparace. Jedná se o procesy, které vedou ke zvýšení životaschopnosti buňky, což je specifická odpověď na některé podněty z vnějšího prostředí, které způsobují zmíněná poškození. Metoda je založena na biochemické analýze indukované β -galaktozidázy. Množství vytvořených enzymů je hodnoceno kolorimetricky.

Test využívá specifického bakteriálního kmene *Escherichia coli* K 12 PQ 37, který byl odvozen od původního kmene *Escherichia coli* GC 4436. Mutagenní aktivita testovaných chemických látek je v SOS chromotestu hodnocena na základě schopností daných látek indukovat SOS reparační systém [1].

Cytogenetická analýza aberací chromozómů periferních lymfocytů

Metoda analýzy aberace chromozómů somatických nebo gametických buněk umožňuje rychle detekovat biologický účinek chemických mutagenů a genotoxických karcinogenů na lidský organizmus. Pro hodnocení účinků genotoxických faktorů působících na lidskou populaci dosahuje nejlepších výsledků při hodnocení abnormalit chromozómů somatických buněk metoda cytogenetické analýzy periferních lymfocytů (CAPL) [30].

Metoda CAPL umožňuje detekci a kvalitativní i kvantitativní analýzu chromozómových abnormalit (strukturálních a numerických aberací) v lidských somatických buňkách in vitro pomocí optického mikroskopu [30]. Poškození genetického materiálu buňky detekované jako chromozómové aberace je projevem biologického působení genotoxických faktorů, jakými jsou chemické sloučeniny a jejich metabolity. Metoda tedy může být využita i k testování účinků aktivních genotoxických faktorů na lidský genetický materiál in vitro [30]. Metoda CAPL slouží jako ukazatel účinků genotoxických faktorů na lidský organizmus a používá se jako biologický skupinový expoziční test [30]

Test na organismu *Drosophilla melanogaster*

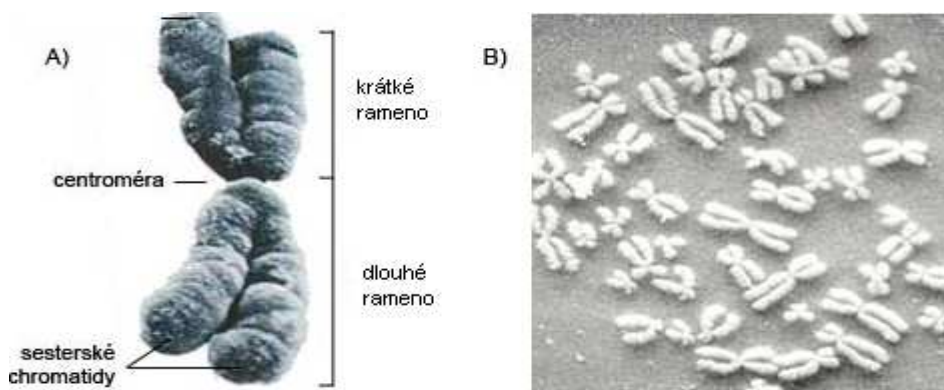
Drosophilla melanogaster (moucha octomilka) je využívána pro in vivo studie v různých oblastech genetiky už několik desetiletí. Nejrozšířenějším testem na tomto organismu je analýza letálních mutací vázaných na pohlaví. Tyto mutace vedou v homozygotním stavu k úhynu organismu. Test umožňuje hodnotit schopnost testované látky indukovat genové mutace na X chromozomu v pohlavních buňkách [31].



Obr. 24: *Drosophilla melanogaster* [32]

Výměna sesterských chromatid

Tato metoda sleduje frekvenci výměn úseků genů mezi chromatidami. Metoda využívá různé dělicí se savčí buňky. Uplatňuje se při studiu mechanismů účinků testované látky [31].



Obr. 25: A) Struktura chromozomu v metafázi, B) Elektronmikroskopický obraz chromozomu v metafázi. [33]

Test tvorby mikrojader

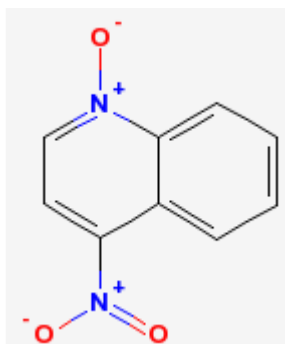
Zralé erythrocyty (červené krvinky) nemají jádro a neobsahují tedy DNA. Mohou však obsahovat části chromozomů pocházejících z nezralých erythrocytů. Mikro jádro (mikronukleolus) je tedy malá částice obsahující částečné nebo celé chromozomy, které během dělení nepřešly do jádra dceřinné buňky. Během buněčného vývoje erythrocytu je hlavní jádro vyloučeno z buňky ven, mikro jádro v buňce zůstává. Test tvorby mikrojader je používán pro studium klastogenity chemických mutagenů [31].

DNA adukty

Metoda analyzuje tvorbu aduktů mutagenu a DNA. Detekce je prováděna pomocí metody HPLC, imunologických metod a „postlabeling“ metod, které využívají radiačně označené genotoxikanty tvořící DNA adukty [30].

3.17.4 4-nitrochinolin-1-oxid (4-NQO)

Jedná se o sloučeninu užívanou ve výzkumu rakoviny k vyvolání nádorů u laboratorních zvířat. Využívá se při testování nových potravin, léčiv, při prevenci rakoviny a jejím výzkumu [34].



Obr. 26: Struktura sloučeniny 4-nitrochinolin-1-oxid (4-NQO) [35]

3.18 Metody stanovení aktivních látek v medu

3.18.1 Extrakce

Extrakce je dělicí (separační) proces. Při extrakci jsou v kontaktu dvě navzájem nemísitelné fáze. Analyzované látky se rozdělují mezi tyto dvě fáze na základě různé rozpustnosti (různé rozdělovací koeficienty) v použitých rozpouštědlech. Čím je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty větší, tím lepší bude jejich rozdělení. Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení a to buď analytu od ostatních látek nebo nežádoucích látek od analytu [36].

3.18.1.1 *Extrakce kapalina-kapalina (LLE = liquid-liquid extraction)*

Technika je založená na rozdělovací rovnováze v soustavě dvou nemísitelných kapalin [36]. Zpravidla se extrakce provádí z vodného prostředí do organického rozpouštědla [37]. Pro efektivní extrakci by rozpouštědlo a extrahovaná látka měli mít co nejbližší polaritu. Polarita je kvantitativně popsána relativní permitivitou rozpouštědla. Polární rozpouštědla mají permitivitu blízkou permitivitě vody ($\epsilon = 80,4$), nepolární rozpouštědla mají permitivitu nízkou (např. benzen, $\epsilon = 2,3$). Rozpouštědla seřazená podle rostoucí polarity tvoří tzv. eluotropní řadu. Rozpouštědla umístěná v této řadě blízko sebe jsou dobře mísitelná, s rostoucím rozestupem se zvyšuje vzájemná nemísitelnost. Platí, že nepolární organické látky extrahujeme nepolárními rozpouštědly a naopak. Při výběru rozpouštědla jsou důležitá ještě další kritéria, například minimální mísitelnost použitých fází, rozpustnost vzorku, rychlost ustavení rozdělovací rovnováhy a další [36].

Nejjednodušší extrakcí je jednostupňová extrakce, která je založena na ustavení jediné rovnováhy mezi fázemi. Nejčastější způsob této extrakce je roztřepání v dělicí nálevce. Po extrakci často následuje izolace extrahované látky z použitého organického rozpouštědla, například použitím odparky [37].

Účinnost extrakce lze snadno zvýšit např. dvojnásobnou extrakcí ovšem za použití polovičního objemu organické fáze. Po opakované extrakci vždy extrakty spojujeme v jeden [36].



Obr. 27: Vakuová odparka HB4 Basic, IKA Labortechnik

3.18.2 Titrace

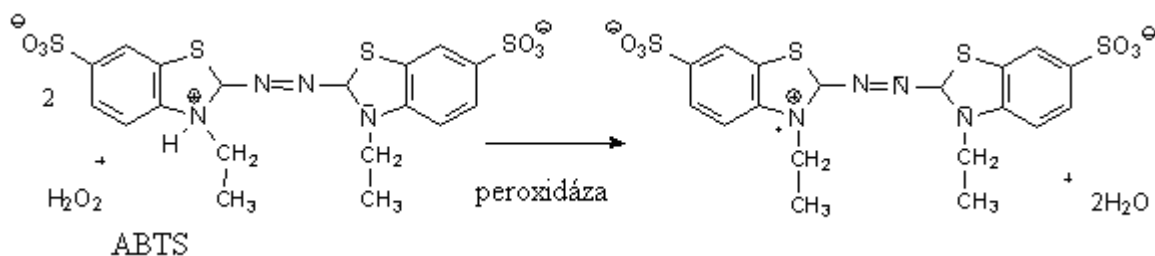
Při titračních metodách se měří objem definovaného roztoku činidla, které reaguje s analyzovanou látkou. Množství stanovené látky se vypočítá z objemu a koncentrace použitého činidla v okamžiku úplného zreagování titračního činidla s analyzovanou látkou. Okamžik úplného zreagování se nazývá bod ekvivalence (ekvivalenční bod) a představuje hodnotu, resp. bod, kdy nastane rovnost látkového množství titrované látky k látkovému množství titračního činidla [38].

3.18.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

3.18.3.1 Metoda ABTS

Je to jedna ze základních a také nepoužívanějších metod ke stanovení celkové antioxidační aktivity (TAS, Total Antioxidant Status). Metoda je založena na schopnosti analyzovaného vzorku zhaset kation-radikál $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazol-6-sulfonát)). Výsledná antioxidační aktivita vzorku je srovnávána s antioxidační aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), proto se metoda někdy nazývá TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [39].

Principem stanovení antioxidační aktivity je tvorba modrozeleného radikálového kationtu vznikajícího inkubací $\text{ABTS}^{\bullet+}$, peroxidázy (methmyoglobin) a peroxidu vodíku. Po přidání vzorku, antioxidanty v něm obsažené zabraňují vzniku zabarvení. Míra inhibice zabarvení odpovídá koncentraci antioxidantů. Konečné zabarvení je změřeno spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm [39].



Obr. 28: Vznik radikálu ABTS při reakci s enzymem peroxidázou [40]

3.18.4 Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Spektrofotometrie v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti patří do skupiny optických metod. Pro tyto metody je charakteristickým společným znakem interakce hmoty s elektromagnetickým zářením. Principem spektrofotometrie UV/VIS je absorpce ultrafialového (vlnová délka 200 - 400 nm) a viditelného (vlnová délka 400 - 800 nm) záření roztoky molekul. Při absorpci UV/VIS záření dochází k přechodům valenčních elektronů ze základních stavů do excitovaných [41].

Prochází-li homogenním prostředím definované záření, jeho počáteční intenzita se zeslabuje o podíl, který je tímto prostředím absorbován. Absorpcí se tedy snižuje intenzita záření, vlnová délka zůstává nezměněná [41].

Absorbance je aditivní veličina; absorbuje-li záření určité vlnové délky více složek v roztoku, celková absorbance je dána součtem absorbancí jednotlivých složek [42].

K měření UV/VIS absorpce se používají spektrofotometry. Každý spektrofotometr obsahuje [41] zdroj záření (wolframová žárovka a vodíková nebo deuteriová lampa), monochromátor (hranol, mřížka, spektrální filtr), kyvetový prostor, detektor (fotočlánek, fotonásobič) a měrné zařízení (galvanometr). Při samotném měření se roztok vzorku proměřuje proti slepému roztoku, který obsahuje všechny látky kromě měřené [41].



Obr. 29: Spektrofotometr Helios δ , Unicam (VB)

3.18.5 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou metody separační. Rozdělují (separují) daný vzorek na jednotlivé sloučeniny. Podle příslušných standardů je pak možno odseparované sloučeniny určit z kvantitativního a také kvalitativního hlediska [37].

Tyto metody jsou založeny na mnohonásobně se ustavující rovnováze všech složek analyzované látky mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna fáze je stacionární, nepohyblivá, a zadržuje jednotlivé složky analyzované směsi. Druhá je mobilní, pohyblivá, a ta naopak vymývá (eluuje) rozdělené složky analyzované látky zadržené na stacionární fázi [41]. Stacionární fáze může být tuhá nebo kapalná, mobilní fáze může být kapalná (kapalinová chromatografie) nebo plynná (plynová chromatografie) [41].

3.18.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) je mobilní fází kapalina, která prostupuje stacionární fází, která je naplněna do kolony. Vysokoúčinná se nazývá proto, že hnací silou mobilní fáze není jen hydrostatický tlak jako u „běžné“ chromatografie, ale vysoce účinné čerpadlo, které umožňuje vyvinout pracovní tlak až 40 MPa. Vysokotlaká čerpadla (též pumpy) umožňují konstantní, regulovatelný a bezpulzní průtok obvykle v rozsahu $0,1 - 10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ [36, 41].

Při samotné analýze je hlavní skutečností signál z detektoru, který vytváří chromatogram. Chromatogram je tedy grafický záznam odezvy detektoru. Obvykle je úměrný koncentraci eluované látky. Skládá se z řady píků, v ideálním případě od sebe oddělených a ležících na základní linii. Chromatogram slouží pro následné kvantitativní i kvalitativní vyhodnocení analýzy [41].

Pro identifikaci separovaných složek směsi je důležitý tzv. retenční čas, což je doba, která uplyne od vstupu vzorku do kolony až do záznamu maxima píku na chromatogramu, resp. je to doba, kterou příslušná sloučenina stráví v koloně. Určení retenčního času je tedy důležité pro identifikaci látky. Pro stanovení koncentrace látky je důležitá plocha píku. Pro určení kvantity i kvality se používá příslušných standardů. Standardizace může být externí (standard je analyzován samostatně) nebo interní (standard je přidán k analyzovanému vzorku) [41].

Z hlediska složení mobilní fáze můžeme separační proces (eluci) rozdělit na izokratický (složení mobilní fáze se nemění po celou dobu analýzy) a na gradientový (složení mobilní fáze se v průběhu analýzy mění, koncentrace jedné složky mobilní fáze roste na úkor druhé). Je-li mobilní fáze vícesložková, je vhodné z důvodu objemové kontrakce objemy jednotlivých složek předem odměřit a smísit [41].

Kolony používané pro HPLC jsou ocelové trubice dlouhé až 25 cm s vnitřním průměrem 2 - 8 mm. Jsou naplněné stacionární fází o velikosti částic 1,5 - 10 μm . Kvalita stacionární fáze (velikost a pravidelný tvar částic, porozita apod.) významně ovlivňuje kvalitu separace. Používá se např. silikagel, oxid hlinitý, speciálně upravené polymery aj.

Kapalinová chromatografie umožňuje analyzovat anorganické ionty, přírodní směsi látek, těkavé, málo těkavé i termolabilní organické sloučeniny [41]. Chromatografie na normálních fázích znamená použití polární stacionární fáze (voda vázaná na silikagel) a nepolární fáze mobilní (hexan). Chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC, Reversed-Phase-HPLC) používá stacionární fázi nepolární (uhlovodíky vázané na silikagel) a mobilní fázi polární (voda, alkoholy, acetonitril) [42].

V kapalinové chromatografii se používají detektory jako fotometrický, refraktometrický, fluorescenční, hmotnostní a další. Nejběžnější je fotometrický detektor. Při dané vlnové délce měří absorbanci mobilní fáze vycházející z kolony. Citlivost je pro různé látky různá a závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu látky při zvolené vlnové délce [36].



Obr. 30: Soustava HPLC Ecom, s.r.o., (ČR)

3.18.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry) je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi. Molekule sledované látky jsou nevratně odštěpovány

elektrony a vzniklé ionty jsou separovány podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z [36, 42].

Na rozdíl od ostatních spektroskopických metod hmotnostní spektrometrie nesleduje rozdíly energetických hladin v molekule, ale stanovuje relativní četnost iontů v závislosti na poměru hmotnosti k náboji iontu (m/z). Tato metoda je destrukční, vzhledem k velmi malé spotřebě vzorku, která se pohybuje v řádech pg až ag, nelze toto považovat za nevýhodu [43].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí [36]:

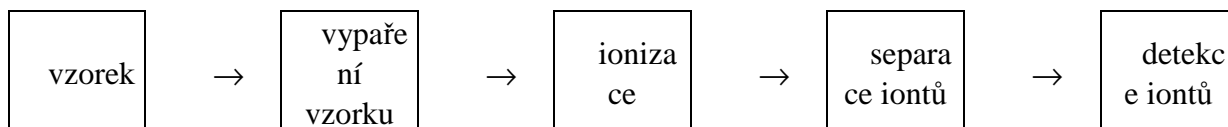
- iontový zdroj (převádí molekuly na nabitě částice, tzv. proces ionizace)
- hmotnostní analyzátor (ve vakuu rozděluje ionty podle poměru m/z)
- detektor (detekuje ionty po rozdělení podle m/z)

Iontový zdroj je základní součástí hmotnostního spektrometru. Podle kritérií těkavosti a stability je lze rozdělit do dvou skupin:

- iontové zdroje pro měření relativně stabilních látek
- iontové zdroje pro měření labilních a těkavých látek

3.18.6.1 Hmotnostní spektrum

Představuje závislost intenzity iontového proudu na hodnotě m/z [36]. Spektrum organické látky obvykle obsahuje více píků. To je způsobeno dělením molekuly při analýze. Nejintenzivnější pík se nazývá základní, jeho intenzita (výška) se obvykle považuje za 100 %. K tomuto píku se vztahují intenzity ostatních píků spektra [43].



Obr. 31: Schéma hmotnostního spektrometru [43]

Hmotnostní spektrometrie se používá k identifikaci a určení struktury organické látky a k určení její molekulové hmotnosti [36].



Obr. 32: Soustava HPLC/MS

3.18.7 Spojení HPLC/MS

Propojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií představuje využití moderních separačních metod k přesné identifikaci a strukturní analýze látek [44].

Takovéto spojení však představuje také jisté technické problémy a to především z hlediska pracovních tlaků. Zatímco kapalinová chromatografie pracuje za vysokého tlaku (MPa), hmotnostní spektrometrie pracuje za hlubokého vakua. Rozdíl mnohdy představuje osm až deset řádů [43].

Hmotnostní spektrometrie je soběstačná dělicí metoda, ovšem pouze v případě, jedná-li se o jednodušší směsi látek. V případě složitých směsí látek se využívá separační schopnosti právě kapalinové chromatografie [45].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci a testování antimutagenity/genotoxicity

Baktopepton - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Sušený kvasničný extrakt - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Bezvodá glukóza p.a. - LachNer, ČR
Agar - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Síran amonný p.a. - LachNer (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný - LachNer (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát - LachNer (ČR)
L-izoleucin - Serva electrophoresis (Německo)
Adenin - Serva electrophoresis (Německo)
L-valin - Serva electrophoresis (Německo)
L-tryptofan - Serva electrophoresis (Německo)
Inositol - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Riboflavin - Serva electrophoresis (Německo)
Thiamin HCl - Serva electrophoresis (Německo)
Pyridoxin HCl - Serva electrophoresis (Německo)
Kyselina nikotinová - Serva electrophoresis (Německo)
Kyselina p-aminobenzoová - Serva electrophoresis (Německo)
Pantothenát vápenatý - Sigma-Aldrich (Německo)
Biotin approx. - Sigma-Aldrich (Německo)
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát - LachNer (ČR)
4-N-nitrochinolin-N-oxid (4-NQO) - Sigma-Aldrich (Německo)
Aceton p.a. - LachNer (ČR)
Ampicilin sodná sůl - Serva (Německo)

4.1.2 Mikroorganismy pro testování antimutagenity/genotoxicity

Kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* D7, který byl poskytnut z Katedry genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě.

4.1.3 Standardní chemikálie

Kyselina L-askorbová - Sigma-Aldrich (Německo)
(-)-Katechin - Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina gallová - Sigma-Aldrich (Německo)
5-(hydroxymethyl)-furfural; 99% - Sigma-Aldrich (Německo)
Rutin hydrát, 95% - Sigma-Aldrich (Německo)
Morin hydrát - Sigma-Aldrich (Německo)
Myricetin - Sigma-Aldrich (Německo)

Luteolin - Sigma-Aldrich (Německo)
Kvercetin dihydrát, 98%, HPLC - Sigma-Aldrich (Německo)
Apigenin approx. 95% - Sigma-Aldrich (Německo)
(±)-Naringenin approx. - Sigma-Aldrich (Německo)
Kaempferol, >96%, BioChemika (ČR)
β-karoten - Fluka, Sigma-Aldrich (Německo)
Retinol - Sigma-Aldrich (Německo)
(±)-α-tokoferol - Sigma-Aldrich (Německo)
Xanthofyll (Lutein) - Sigma-Aldrich (Německo)
Katechin gallát - Sigma-Aldrich (Německo)
Epikatechin - Sigma-Aldrich (Německo)
Epikatechin gallát - Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina ferulová p.a. - Fluka, Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina chlorogenová 95% - Sigma-Aldrich (Německo)
2,6-dichlorindofenol sodná sůl - Sigma-Aldrich (Německo)

4.1.4 Ostatní chemikálie

Kyselina octová - LachNer (ČR)
Octan sodný trihydrát p.a. - Lachema (ČR)
Ethanol - LachNer (ČR)
Methanol - LachNer (ČR)
Dusitan sodný - Lachema (ČR)
Chlorid hlinitý - Lachema (ČR)
Hydroxid sodný - LachNer (ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo - RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové (ČR)
Uhličitan sodný p.a. - LachNer (ČR)
Kyselina octová p.a., 99,8% - LachNer (ČR)
Acetonitril pro MS - ULC/MS, Biosolve (Holandsko)
Kyselina octová pro MS - Biosolve (Holandsko)
Acetonitril pro HPLC - LachNer (ČR)
Ethanol pro UV spektroskopii - LachNer (ČR)
Methanol pro HPLC - LachNer (ČR)
Ethylacetát p.a. - LachNer (ČR)
Kyselina orthofosforečná 85% - Lachema (ČR)
Diethylether nestabilizovaný, p.a. - LachNer (ČR)
Kyselina chlorovodíková p.a., 35% - Lachema (ČR)
„Total Antioxidant Status kit“ - Randox Laboratories Ltd. (USA)

4.1.5 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy - Boeco (Německo)
pH-metr - HI221 Calibration Check, Microprocessor pH meter, Hanna instruments (USA)
Magnetická míchačka - Color squid HARRY, IKA (Německo)
Ultrazvuk - PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)
Spektrofotometr - Helios δ, Unicam (VB)

Vortex - Genius 3, IKA Vortex (Německo)
 Vortex - TK3S, TecnoKartell (Německo)
 Předvážky - Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)
 Filtry - ValuPrep®, 25 mm, Syringe Filter with 0,45 µm PTFE Membrane
 Filtry - Stříkačkový filtr PROFIL 25 mm, PTFE, porozita 0,2 µm
 Vakuová odparka - HB4 Basic, HBA Labortechnik
 Centrifuga - U-32-R, Boeco (Německo)
 Termostat - Raven 2 Incubator (USA)
 Termostat - Memmert GmbH + Co. KG (Německo)
 Laminární box Aura Mini - Bio Air Instruments (USA)
 Centrifuga
 Mikroskop - Intraco Micro (ČR)
 Mikropipety - BioHit Proline (Finsko)
 Mikropipety - Discovery (Německo)
 Soustava HPLC, Ecom spol. s.r.o. (ČR) – analýza flavonoidů HPLC/UV-VIS
 - Termostat - LCO 102 LONG
 - Pumpa, programátor gradientu - Beta 10
 - Detektor - LCD 2084
 - Degaser - DG 3014
 Kolona - XDB C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm, Agilent Eclipse
 Vyhodnocovací systém Clarity
 Držák předkolony - KJO - 4282, ECOM (ČR)
 Předkolony - AJO - 4287, ECOM (ČR)
 Soustava HPLC/MS
 - Termostat - LCO 101, Column Oven
 - Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
 - Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
 - Hmotnostní spektrometr - LCQ Advantage MAY, Finnigan
 Kolona - ULTRA Aqueous, C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm
 Vyhodnocovací systém Xcalibur
 Soustava HPLC, Ecom spol. s.r.o. (ČR) – analýza sacharidů HPLC/RI
 - Detektor - RIDK 102, Laboratorní přístroje Praha
 - Termostat - LCO 101, Column oven
 - Gradient - Gradient Programmer GP 5, Ecom (ČR)
 - Pumpa - LCP 4020, Ecom (ČR)
 Kolona - Zorbax, NH₂, 5 µm, 4,6 x 150 mm
 Envirocheck ® Contact YM(R) - Merck KGaA (Německo)
 Envirocheck ® Contact TVC - Merck KGaA (Německo)

4.1.6 Materiál

K analýzám bylo použito celkem 27 vzorků, z toho 25 vzorků medů, 1 vzorek byla směs připravená v laboratoři a 1 vzorek propolisu. 19 vzorků medů bylo zakoupeno v supermarketech, v prodejnách s biopotravinami nebo ve specializovaných včelařských prodejnách. Vzorky byly zakoupeny v prosinci 2007 a všechny byly otevřeny ve stejnou dobu před první analýzou. 6 vzorků bylo zakoupeno přímo od včelaře v červenci 2007, tyto vzorky

byly otevřeny již dříve. Propolis byl zakoupen ve specializované včelařské prodejně. 1 vzorek byla směs připravená v laboratoři z květového medu, propolisu a mateří kašičky (tabulka 10).

Všechny medy, směs a také propolis byly skladovány v laboratoři v temnu a při stálé teplotě 19 °C.

Jednotlivé druhy medů, jejich složení (pokud bylo uvedeno), země původu, případně jiné poznámky jsou uvedeny v tabulce 10 a 11.



Obr. 33: Medy, které byly podrobeny analýzám.

4.2 Testování antimutagenity/genotoxicity na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* D7

4.2.1 Kultivace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* D7

Buňky kvasinkového kmene *Saccharomyces cerevisiae* D7 byly kultivovány v tekutém optimálním médiu (YPD) o složení [46]:

YPD médium

baktopepton	1,2 g
sušený kvasničný extrakt	1,2 g
glukóza	1,2 g
agar (pro pevné médium)	2,4 g
destilovaná voda	120 ml

Médium bylo sterilizováno 30 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa. Po vychlazení bylo 120 ml média očkováno 3 kličkami kultury kvasinek. Takto připravená buněčná suspenze

v exponenciální fázi růstu, tj. po 16 až 18 hodinách, byla určena pro testy antimutagenity. Kolonie buněk na pevném médiu byly použity pro dlouhodobější uchovávání při teplotě 2 - 8 °C [46].

4.2.1.1 Selektivní média

Při testování antimutagenity/genotoxicity na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* D7 byla používána následující selektivní média [46]:

Pevné minimální médium

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,71 g
KH ₂ PO ₄	1,41 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,71 g
glukóza	14,14 g
agar	14,14 g
destilovaná voda	660 ml

Selektivní médium pro sledování mitotické genové konverze (Trp – konverze)

minimální medium	660 ml
adenin	18,86 mg
L-izoleucin	56,57 mg
L-valin	56,57 mg
vitaminový roztok	3,80 ml

Selektivní médium pro sledování reverzní mutace (Ile – reverze)

minimální medium	660 ml
adenin	37,72 mg
L-tryptofan	37,72 mg
vitaminový roztok	7,60 ml

Při přípravě selektivních médií byly navážky aminokyselin rozpuštěny v 50 ml sterilní destilované vody.

Vitaminový roztok byl přidáván po sterilizaci a mírném vychlazení média. Složení vitaminového roztoku je následující:

Vitaminový roztok

inositol	100 mg
riboflavin	30 mg
thiamin	10 mg
pyridoxin	6 mg
kyseliny nikotinová	6 mg
kyselina p-aminobenzoová	6 mg
pantothenát vápenatý	6 mg
biotin	0,1 mg

destilovaná voda	40 ml
------------------	-------

Sörensenův (fosfátový) tlumivý roztok

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	7,1367 g
KH ₂ PO ₄	1,8150 g
destilovaná voda	500 ml

4.2.2 Postup testování antimutagenních účinků na kvasinkách *S. cerevisiae* D7

V exponenciální fázi růstu, které bylo dosaženo po 16 až 18 hodinách kultivace při 28 °C, byla buněčná suspenze kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* D7 rozdělena do zkumavek po 10 ml. Buňky byly centrifugovány 5 minut při 4500 ot.min⁻¹ a teplotě 20°C. Buněčný sediment byl 2krát promyt fosfátovým pufrům o pH 7. Pro vyvolání mutace byl použit standardní mutagen 4-NQO o hmotnostní koncentraci 0,06 mg.ml⁻¹ v 99,5 % acetonu [46].

K 9 ml (popř. 8 ml) buněčné suspenze kvasinek ve fosfátovém pufru bylo přidáno 0,1 ml roztoku mutagenu a 1 ml (popř. 2 ml) roztoku medu. Po 20 hodinách působení v přítomnosti 5 µl ampicilinu (100 µg.ml⁻¹) byly buňky opět centrifugovány (4500 ot.min⁻¹, 5 minut) a 2krát promyty fosfátovým pufrům o pH 7 [46].

Na selektivní médium pro sledování mitotické genové konverze kvasinkových buněk vyjádřené počtem kolonií Trp - konvertantů byl přenesen 0,1 ml buněčné suspenze o obsahu 10⁶ buněk.ml⁻¹. U selektivního média pro hodnocení reverzní mutace stanovené jako počet kolonií Ile - revertantů bylo inokulováno 0,1 ml buněčné suspenze o obsahu 10⁷ buněk.ml⁻¹. Počet konvertantů byl hodnocen po 5 dnech, zatímco počet revertantů po 10 dnech inkubace při teplotě 28°C [46].

Při každém testování byly zařazeny následující kontrolní a analyzované vzorky:

Pozitivní kontrola = buňky ovlivněné pouze 0,1 ml roztokem 4-NQO (0,06 mg.ml⁻¹ v 99,5 % acetonu)

Negativní kontrola = buňky ovlivněné pouze rozpouštědlem mutagenu - 0,1 ml 99,5 % acetonem

Spontánní reverze = ničím neovlivněné buňky testovacího kmene

Antimutagenní aktivita medu = buňky ovlivněné 0,1 ml roztoku mutagenu (4-NQO) a 1 ml (2 ml) roztoku medu

Letální kontrola = buňky ovlivněné 1 ml (2 ml) roztoku medu

Všechna měření byla provedena 3 krát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka (SD) průměru. Výpočet procenta inhibice antimutagenních/genotoxických účinků byl proveden podle rovnice:

$$\% \text{ inhibice} = 100 - [(X_1/X_2) \cdot 100]$$

X₁...počet kolonií kvasinek na Petriho misce v přítomnosti roztoku mutagenu a antimutagenu
X₂...počet kolonií kvasinek na Petriho misce v přítomnosti pouze mutagenu.

4.3 Testování povrchové mikroflóry

Pro stanovení povrchové mikroflóry byly použity jednorázové otiskové testy Envirocheck® Contact YM(R) Merck.

Navážka 3 g medu byla rozpuštěna ve 3 ml destilované vody. Roztok byl sterilní špičkou nanesen na povrch agarů, kde působil po dobu 10 vteřin. Totéž bylo provedeno pro druhou stranu otiskového pruhu. Poté byly pevně uzavřené lahvičky uloženy do termostatu, kde byly inkubovány při teplotě 30 °C. Po 48 hodinách byl odečten počet kolonií na straně 1. Po 5 – 7 dnech byl odečten počet kolonií na straně 2. Celkový počet mikroorganismů byl vyhodnocen podle příloženého návodu od výrobce.

strana 1 - CASO agar obsahující TTC (trifenyltetrazoliumchlorid): kolonie představují celkový počet aerobních bakterií. Přítomnost bakterií je indikována růstem červených kolonií.
strana 2 - Růžový agar obsahující chloramfenikol: kolonie plísň představují přítomnou plísňovou kontaminaci, kolonie kvasinek jsou červeno-růžové. Chloramfenikol inhibuje růst bakterií.

4.4 Stanovení aktivních látek v medu

4.4.1 Stanovení celkových polyfenolů

Obsah celkových polyfenolů byl stanoven fotometrickou metodou s použitím Folin-Ciocalteuova činidla. Činidlo bylo desetkrát zředěno destilovanou vodou. Jako standard byl použit 6 M roztok kyseliny gallové rozpuštěné v absolutním ethanolu. Nasycený roztok uhličitanu sodného představuje 7,5 g Na₂CO₃ rozpuštěného v 95 ml destilované vody.

4.4.1.1 Vlastní stanovení

Navážka 1 g vzorku byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody, navážka 0,1 g propolisu byla rozpuštěna v 10 ml absolutního ethanolu. Do zkumavek bylo pipetováno 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl roztoku vzorku. Vše bylo důkladně promícháno a ponecháno 5 minut v klidu stát. Poté byl přidán do každé zkumavky 1 ml nasyceného roztoku NaCO₃, opět bylo důkladně promícháno a necháno 15 minut reagovat. Poté byly vzorky proměřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Jako slepý vzorek bylo použito pouze zředěné Folin-Ciocalteuovo činidlo.

4.4.1.2 Sestavení kalibrační křivky

Přesně navážené množství kyseliny gallové bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno po rysku absolutním ethanolom. Z tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,106 - 0,530 mg.ml⁻¹. Do zkumavek bylo pipetováno 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované H₂O a 50 µl standardního roztoku kyseliny gallové. Vše bylo důkladně promícháno a ponecháno 5 minut v klidu stát. Poté byl přidán do každé zkumavky 1 ml nasyceného roztoku NaCO₃, opět bylo důkladně promícháno a necháno 15 minut reagovat. Poté byly vzorky proměřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Jako slepý vzorek bylo použito pouze zředěné Folin-Ciocalteuovo činidlo.

4.4.2 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení obsahu celkových flavonoidů bylo provedeno metodou s hlinitou solí a dusitanem. Jako standard byl použit 1 M roztok katechinu rozpuštěného v absolutním ethanolu. Pro analýzu byl použit 5% roztok dusitanu sodného NaNO_2 , 10% roztok chloridu hlinitého AlCl_3 , 1 M roztok hydroxidu sodného NaOH .

4.4.2.1 Vlastní stanovení

Navážka 1,0 g vzorku medu byla rozpuštěna v 1,00 ml destilované vody, navážka 0,1 g propolisu byla rozpuštěna v 10 ml absolutního ethanolu. Do zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml roztoku vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml roztoku dusitanu sodného. Vše bylo důkladně promícháno a ponecháno v klidu stát 5 minut. Poté bylo přidáno 0,2 ml roztoku chloridu hlinitého. Opět bylo vše promícháno a ponecháno 5 minut v klidu stát. Poté bylo přidáno 1,5 ml hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Vše bylo promícháno a ponecháno stát 15 minut. Poté byly vzorky proměřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 510 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

4.4.2.2 Sestavení kalibrační křivky

Přesně navážené množství katechinu bylo rozpuštěno v absolutním ethanolu. Z tohoto zásobního roztoku byla naředěna kalibrační řada o koncentraci $0,6 - 3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Do zkumavek bylo pipetováno 0,5 ml standardního roztoku katechinu, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml roztoku dusitanu sodného. Vše bylo důkladně promícháno a ponecháno v klidu stát 5 minut. Poté bylo přidáno 0,2 ml roztoku chloridu hlinitého. Opět bylo vše promícháno a ponecháno 5 minut v klidu stát. Poté bylo přidáno 1,5 ml hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Vše bylo promícháno a ponecháno stát 15 minut. Poté byly vzorky proměřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 510 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

4.4.3 Stanovení celkové antioxidační kapacity pomocí ABTS

Pro stanovení celkové antioxidační kapacity byla použita diagnostická souprava Total Antioxidant Status (TAS). Stanovení bylo provedeno podle postupu přiloženého k diagnostické soupravě výrobcem.

1,0 g vzorku medu byl rozpuštěn v 1,00 ml destilované vody, navážka 0,1 g propolisu byla rozpuštěna v 10 ml absolutního ethanolu. 10 μl tohoto roztoku bylo pipetováno do kyvety a smícháno s 0,5 ml chromogenu. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 600 nm proti vzduchu. Ke směsi v kyvetě bylo přidáno 100 μl substrátu (peroxid vodíku) a přesně po třech minutách byla znova změřena absorbance. Stejným způsobem byly proměřeny absorbance také u standardu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-karboxylová kyselina) a blanku, kde namísto vzorku byla použita deionizovaná voda.

Z rozdílu absorbancí standardu a blanku byl dle návodu výrobce vypočten faktor. Z hodnoty faktoru a rozdílu absorbancí u vzorku byla vypočtena celková antioxidační kapacita („Total Antioxidant Status kit“ - Randox Laboratories Ltd. (USA)).

$$\text{faktor} = \frac{\text{koncentrace standardu}}{(\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ standard})}$$

$$\text{TAS (mmol.l}^{-1}\text{)} = \text{faktor} \cdot (\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ vzorek}).$$

4.4.4 Titrační stanovení kyseliny askorbové

Navážka 4,0 g vzorku medu byla rozpuštěna v malém množství 2% kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a po rysku doplněn 2% HCl. Takto připravený roztok byl převeden do titrační baňky a titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolu o koncentraci 0,0005 M do lososově růžového zbarvení stálého minimálně 15 sekund.

Obsah kyseliny askorbové u vzorku propolisu byl stanoven dvěma způsoby:

- 1) navážka propolisu byla rozpuštěna v 2% HCl a poté titrována
- 2) navážka propolisu byla rozpuštěna v ethanolu a poté titrována.

Pro standardizaci byla navážka 10 mg kyseliny L-askorbové rozpuštěna v malém množství 2% HCl a následně kvantitativně převedena do 10 ml odměrné baňky, objem byl doplněn po rysku. Do titrační baňky bylo pipetováno 10 ml 2% HCl a 1 ml roztoku standardu. Takto připravený roztok byl titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolu o koncentraci 0,0005 M do lososově růžového zbarvení stálého minimálně 15 sekund.

4.4.5 Stanovení obsahu α - a β -karotenu, α -tokoferolu a luteinu pomocí metody HPLC

4.4.5.1 *Extrakce a analýza*

Navážka 3 g vzorku byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Poté byla provedena extrakce lipofilních látek diethyletherem. K vodnému roztoku vzorku byl přidán diethylether a směs byla protřepána. Po oddělení vrstev byla vrchní diethyletherová vrstva odpipetována do připravené odpařovací baňky. Ke zbylé vodné vrstvě byl znovu přidán diethylether a extrakce byla zopakována. Druhá odpipetovaná diethyletherová vrstva byla přidána k první. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn 1 ml methanolu, centrifugován a použit k analýze.

Stanovení obsahu lipofilních látek bylo provedeno metodou RP-HPLC. Analýza byla provedena na koloně Agilent Eclipse (C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze pro eluci byl zvolen methanol. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,1 ml·min⁻¹. Objem dávkovací smyčky byl 20 μ l. Teplota separace byla 45 °C. Detekce byla provedena spektrofotometricky při vlnových délkách 289 nm pro α -tokoferol, 450 nm pro karotenoidy. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno s použitím externí kalibrace pomocí příslušných standardů.

4.4.5.2 *Sestavení kalibrační křivky*

Přesně navážená množství standardů byla rozpuštěna v absolutním ethanolu, ze zásobních roztoků byla připravena řada pracovních roztoků o koncentracích pro β -karoten 0 - 300 μ g.ml⁻¹, pro α -tokoferol 0 - 50 μ g.ml⁻¹, pro lutein 0 - 3 μ g.ml⁻¹.

Analýza standardů byla provedena metodou RP-HPLC za stejných podmínek jako analýza vzorků medu (viz kap. 4.4.5.1).

4.4.6 Stanovení obsahu katechinů pomocí metody HPLC

4.4.6.1 Extrakce a analýza

Navážka 1 g vzorku medu byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Po zcentrifugování (5 min, 15 000 rpm) byl roztok přímo použit k analýze.

Analýza obsahu katechinů byla provedena metodou RP-HPLC. Separace probíhala na koloně Agilent Eclipse (C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byla po předchozím testování použita směs voda - methanol v poměru 75 : 25. Objem dávkovací smyčky byl 20 μ l. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,75 ml.min⁻¹. Teplota separace byla 30 °C. Detekce byla provedena spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno s použitím externí kalibrace pomocí příslušných standardů.

4.4.6.2 Sestavení kalibrační křivky

Přesně navážená množství standardů byla rozpuštěna v absolutním ethanolu. Ze zásobních roztoků byla připravena řada pracovních roztoků o koncentracích:

- pro katechin 0 - 200 μ g.ml⁻¹, pro katechin gallát 0 - 100 μ g.ml⁻¹, pro epikatechin 0 - 1000 μ g.ml⁻¹, pro epikatechin gallát 0 - 75 μ g.ml⁻¹, pro kyselinu ferulovou 0 - 100 μ g.ml⁻¹, pro kyselinu chlorogenovou 0 - 300 μ g.ml⁻¹.

Analýza standardů katechinů byla provedena metodou RP-HPLC za stejných podmínek jako analýza medů (kap. 4.4.6.1).

4.4.7 Stanovení obsahu jednotlivých flavonoidů pomocí metody HPLC

4.4.7.1 Extrakce a analýza

Navážka 1 g vzorku medu byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Poté byla provedena extrakce flavonoidů ethylacetátem. K vodnému roztoku vzorku byl přidán ethylacetát a směs byla protřepána. Po oddělení vrstev byla vrchní ethylacetátová vrstva odpipetována do připravené odpařovací baňky. Ke zbylé vodné vrstvě byl znovu přidán ethylacetát a extrakce byla zopakována. Druhá odpipetovaná ethylacetátová vrstva byla přidána k první. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze, která byla rovněž použita pro eluci, centrifugován (5 min, 15 000 rpm) a použit k analýze.

Obsah jednotlivých flavonoidů ve vzorku propolisu byl stanoven dvěma způsoby:

- 1) navážka propolisu byla rozpuštěna v 10 ml absolutního ethanolu a poté byla smíchána s ethylacetátem a odpařena
- 2) navážka propolisu byla přímo rozpuštěna v ethylacetátu a odpařena

Stanovení obsahu flavonoidů bylo provedeno metodou RP-HPLC. Analýza byla provedena na koloně Agilent Eclipse (C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril - methanol - destilovaná voda - kyselina fosforečná v poměru 30 : 20 : 49,5 : 0,5 [47]. Teplota separace byla 30 °C. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,75 ml.min⁻¹, objem dávkovací smyčky 20 μ l. Detekce byla provedena spektro-

fotometricky při vlnové délce 370 nm. Separace trvala 10 minut. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno s použitím externí kalibrace pomocí příslušných standardů.

4.4.7.2 Sestavení kalibrační křivky

Přesně navážená množství standardů byla rozpuštěna v absolutním ethanolu (vyj. rutin rozpuštěn v methanolu). Ze zásobních roztoků byla připravena řada pracovních roztoků o koncentracích pro rutin 0 - 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro morin 0 - 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro myricetin 0 - 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro luteolin 0 - 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro kvercetin 0 - 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro apigenin 0 - 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro naringenin 0 - 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro kaempferol 0 - 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Analýza standardů flavonoidů byla provedena metodou RP-HPLC za stejných podmínek jako analýza medů (kap. 4.4.7.1).

4.4.8 Stanovení obsahu hydroxymethylfurfuralu pomocí metody HPLC

4.4.8.1 Extrakce a analýza

Navážka 1 g medu byla rozpuštěna v 2,5 ml destilované vody. Roztok byl zcentrifugován a přímo použit k analýze.

Stanovení obsahu hydroxymethylfurfuralu (HMF) bylo provedeno metodou RP-HPLC. Separace probíhala na koloně Agilent Eclipse (C18, 5 μm , 4,6 x 150 mm). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byl použit 1% vodný roztok kyseliny octové - acetonitril v poměru 97 : 3 [47]. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem dávkovací smyčky byl 20 μl . Teplota separace byla 30 °C. Detekce byla provedena spektrofotometricky při vlnové délce 284 nm. Separace trvala 10 minut. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s využitím standardu hydroxymethylfurfuralu.

Kalibrační křivka byla sestavena pomocí přesně odváženého množství hydroxymethylfurfuralu rozpuštěného v 1 ml absolutního ethanolu. Z takto připraveného zásobního roztoku byly postupně ředěním připraveny pracovní roztoky o koncentracích 0 - 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Analýza standardu hydroxymethylfurfuralu (HMF) byla provedena metodou RP-HPLC za stejných podmínek jako analýza medů (viz výše).

4.4.9 Stanovení vybraných sacharidů

Navážka 1 g medu byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Roztok byl centrifugován a přímo použit k analýze.

Stanovení obsahu sacharidů v medech bylo provedeno metodou HPLC. Separace probíhala na koloně Zorbax-Eclipse (NH_2 , 4,6 x 150 mm, 5 μm). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril : destilovaná voda v poměru 75 : 25. Průtok byl nastaven na 1,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Objem dávkovací smyčky byl 20 μl . Teplota separace byla 25 °C. Detekce byla provedena pomocí refraktometrického detektoru. Separace trvala 20 minut. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s využitím standardů příslušných sacharidů ředěných v rozmezí: pro sacharózu 0 - 5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro glukózu 0 - 5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro fruktózu 0 - 5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro melezitózu 0 - 10 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ [48, 49].

4.4.10 Stanovení flavonoidů a katechinů pomocí metody HPLC/MS

K analýze byl využit systém pro RP-HPLC/PDA/ESI-MS, tzn. kapalinová chromatografie s detekcí PDA a následně hmotnostní detekcí s elektrosprejovou ionizací a analyzátozem typu iontová past. Hmotnostní analyzátor byl optimalizován na epikatechin. Příslušný kvazi-molekulární ion o m/z 291 byl detekován v kladném módu. Parametry ladící metody jsou uvedeny v tabulce č. 8:

Tab. 8: Parametry ladící metody.

parametr MS	kladný mód
množství sušicího plynu (arb)	40
napětí na kapiláře ESI (kV)	5
teplota na vstupní kapiláře (°C)	250
napětí na vstupní kapiláře (V)	40

Tab. 9: Složení mobilní fáze v průběhu gradientové eluce.

	Časový úsek	Mobilní fáze: 1% kyselina octová :ACN
1. Lineární gradient	3 min	60-57 % kys. octové : 40-43 % ACN
2. Lineární gradient	20 min	57-55 % kys. octové:43-45 % ACN
3. Lineární gradient	10 min	55-45 % kys. octové:45-55 % ACN
4. Izokratický průtok	30 min	45 % kys. octové:55 % ACN

4.4.10.1 Stanovení katechinů

Za účelem stanovení obsahu katechinů byla navážka 1 g vzorku medu rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Po zfiltrování byl roztok přímo použit k analýze.

Separace katechinů byla provedena metodou RP-HPLC/PDA (PDA – photo diode array) za podmínek přizpůsobených jak on-line hmotnostní detekci, tak i předchozímu stanovení RP-HPLC/UV-VIS. Separace probíhala na koloně ULTRA Aqueous (C18, 5 μ m, 250 x 4,6 mm). Gradientová eluce byla provedena směsí 1% kyselina octová - acetonitril (viz tabulka 9). Objem dávkovací smyčky byl 20 μ l. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,4 ml.min⁻¹. Teplota separace byla 30 °C. K detekci byl použit PDA detektor a současně on-line hmotnostní detektor. Analýza trvala 53 minut.

4.4.10.2 Stanovení jednotlivých flavonoidů

Pro stanovení jednotlivých flavonoidů byla navážka 1 g vzorku medu rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Poté byla provedena extrakce flavonoidů ethylacetátem (viz kap. 4.4.7.1). Odparek byl rozpuštěn v 1 ml směsi destilovaná voda - acetonitril v poměru 1 : 1, zfiltrován a použit k analýze.

Separace flavonoidů byla provedena metodou RP-HPLC. Separace byla provedena na koloně ULTRA Aqueous (C18, 5 μ m, 250 x 4,6 mm) izokraticky za stejných podmínek jako u katechinů (kap. 4.4.10.1).

5 CÍL PRÁCE

Cílem předložené práce je studium antimutagenního efektu několika druhů medu různého druhu a původu a souvislost tohoto efektu s parametry charakterizujícími antioxidační status.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- analýza antimutagenního/genotoxického efektu vybrané skupiny medů s využitím eukaryotického testovacího systému *Saccharomyces cerevisiae* D7
- analýza obsahu vybraných skupinových parametrů charakterizujících antioxidační vlastnosti medů (celkové polyfenoly, celkové flavonoidy, antioxidační aktivita)
- analýza obsahu individuálních antioxidantů pomocí HPLC/UV-VIS a LC/MS, srovnání výpovědní hodnoty obou metod k posouzení autenticity medů
- sledování vlivu dlouhodobého skladování medu na obsah antioxidantů

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výběr biologického materiálu

Pro analýzu antimutagenních vlastností a vybraných aktivních látek v medu byly využity vzorky medů popsané v tabulce 10 a 11. U těchto medů byly v předchozí diplomové práci analyzovány některé charakteristiky, které byly použity jako výchozí hodnoty pro posouzení dlouhodobé stability medu v průběhu uchovávání [47]. Veškeré medy byly po celou dobu studia (od listopadu 2007 do května 2009) skladovány ve stálých podmínkách: v uzavřených nádobách ve tmě, suchu a při stálé teplotě 20°C (klimatizovaná místnost). Žádný z medů nepřekročil po celou dobu studia záruční lhůtu. V některých medech v průběhu uchovávání vzrostla míra krystalizace, avšak prakticky z každého bylo možné odebrat homogenní vzorek. Navážky byly vždy rozpouštěny v destilované vodě o teplotě 20°C. Žádný z medů nebyl před analýzami jakkoli tepelně upravován.

Tab. 10: Druhy medů, které byly podrobeny analýzám, jejich složení a země původu

č.	Druh medu	Složení	Země původu	Poznámka
1	lipový	neuvedeno	ČR	2006
2	květový (šlehaný)	neuvedeno	ČR	2007
3	květový (šlehaný)	neuvedeno	ČR	2006
4	slunečnicový	neuvedeno	ČR	2006
5	řepkový (natural)	neuvedeno	ČR	-
6	řepkový (pastovaný)	neuvedeno	ČR	-
7	luční (květový)	neuvedeno	ES a mimo ES	supermarket
8	lesní (květový smíšený)	neuvedeno	ES a mimo ES	supermarket
9	luční (květový)	neuvedeno	ES a mimo ES	supermarket
10	lesní	med medovicový a med květový	ES a mimo ES	supermarket
11	květový smíšený	neuvedeno	ČR	„klasa A“
12	s tymiánem a bylinami	luční 60 %, lesní 20 % a tymiánový 20 %	Řecko	
13	akátový	neuvedeno	Slovensko	-
14	mateří kašička v medu	med květový pastovaný 98,2 %, mateří kašička 1,0 % a kys. akorbová 0,8 %	ČR	-
15	luční (z lučních květů)	neuvedeno	Itálie	biomed
16	med z eukalyptových květů	neuvedeno	Itálie	biomed
17	luční	neuvedeno	Itálie	biomed
18	akátový	neuvedeno	Itálie	biomed
19	med z pomerančových květů	neuvedeno	Itálie	biomed
20	luční *	neuvedeno	Itálie	biomed
21	akátový *	neuvedeno	Itálie	biomed

22	med z pomerančových květů *	neuvedeno	Itálie	biomed
23	„včelí mystérium“	med medovicový, mateří kašička, pyl a propolis	ČR	-
24	pohankový	neuvedeno	ČR	-
25	maliníkový	neuvedeno	ČR	-
26	ostropestřec mariánský	neuvedeno	ČR	-
27	květový	neuvedeno	ČR	-
28	medovicový	neuvedeno	ČR	-

Tab. 11: Parametry složení a země původu pro propolis a směs připravenou v laboratoři.

č.	Produkt	Složení	Země původu	Poznámka
29	propolis	neuvedeno	ČR	-
30	směs připravená v laboratoři	med květový 98,06 %, mateří kašička 0,97 % a propolis 0,97 %	ČR	-

Poznámka pro tab. 10 a 11: - = bez poznámky, ČR = Česká republika, ES a mimo ES = ze zemí Evropského společenství a ze zemí mimo země Evropského společenství. Medy číslo 7, 8, 9, 10 byly zakoupeny v supermarketech a med číslo 11 dosáhl ocenění kvality „klasa A“. Med číslo 2 byl stočen a upraven na šlehaný v roce 2007, med číslo 3 pak v roce 2006. Medy číslo 1 a 4 byly také vyrobeny v roce 2006. Medy č. 20, 21, 22 označeny * byly zakoupeny v únoru 2009. Med číslo 27, tj. směs připravená v laboratoři, byla připravena smícháním 2,0 g propolisu a 2,0 g mateří kašičky s 201,6 g květového medu.

Pro přehlednost a lepší srovnatelnost výsledků byly vzorky medů rozděleny do čtyř skupin. První skupina představuje medy, kde zdrojem nektaru popřípadě medovice byly především stromy. Druhá skupina jsou medy smíšené luční a lesní a med medovicový. Ve třetí skupině jsou medy luční a květové různě upravené pořízené jak v supermarketu, tak také přímo od včelaře. Čtvrtá skupina zahrnuje medy jednodruhové, popřípadě s převažující složkou.

Tab. 12: Rozdělení medů do skupin.

č.	Druhy medů
1	1, 13, 16, 18, 19, 23, 28
2	7, 8, 9, 10, 11, 27, 28
3	2, 3, 11, 15, 17, 27
4	4, 5, 6, 12, 24, 25, 26

6.2 Stanovení antimutagenních/genotoxických vlastností

Pro stanovení antimutagenních/genotoxických vlastností byl použit kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* D7. Testování bylo provedeno podle návodu (viz kapitola 4.2).

Antimutagenní účinek byl hodnocen jako schopnost antimutagenu (v tomto případě roztoku medu) inhibovat tvorbu mutantních kolonií (Trp - konverze, Ile - reverze) kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* D7. Inhibice byla vyjádřena v procentech úbytku kolonií

ve srovnání s působením standardního mutagenu (pozitivní kontrola). Žádný z medů nevykazoval genotoxické vlastnosti (letální kontrola).

V tab. 13 a 14 jsou uvedeny výsledky analýzy antimutagenity při použití dvou různých koncentrací medu v inkubační směsi s kurantním kmenem *S. cerevisiae* D7 (kap. 4.2)

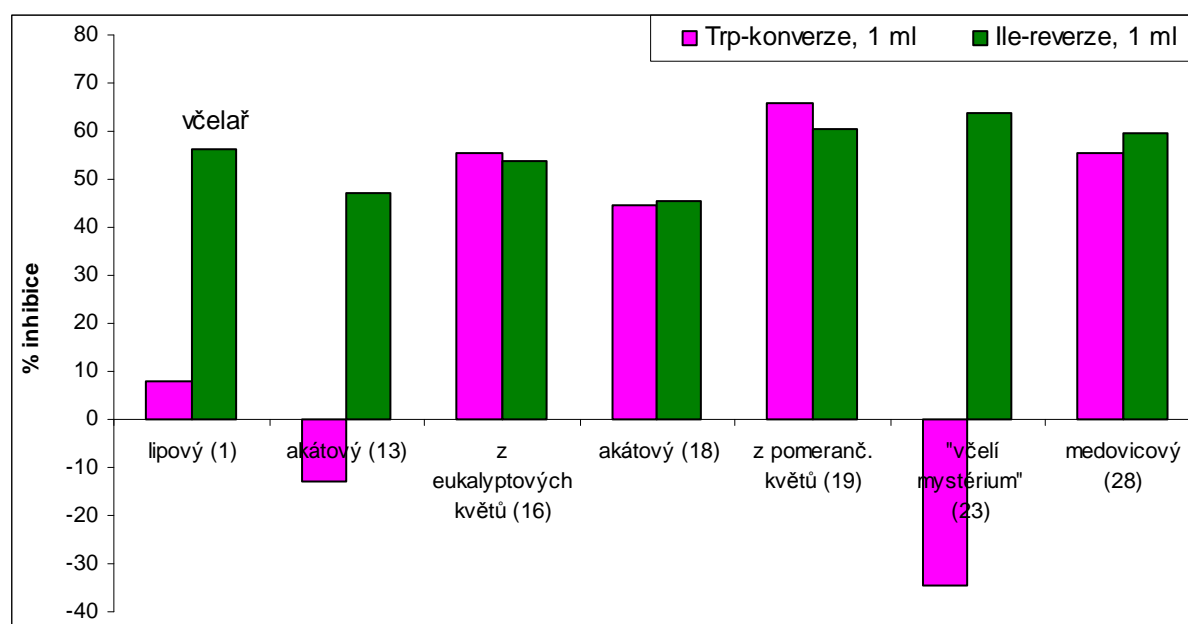
Tab. 13: Antimutagenní účinky medu (*nižší koncentrace*).

č.	Druh medu	Trp konverze [%]	Ile reverze [%]
1	lipový	8,00 ± 0,79	56,37 ± 5,22
2	květový (šlehaný)	50,00 ± 4,34	67,26 ± 4,62
3	květový (šlehaný)	28,71 ± 2,65	79,11 ± 4,62
4	slunečnicový	-	60,89 ± 6,32
5	řepkový (natural)	69,07 ± 5,43	74,19 ± 6,42
6	řepkový (pastovaný)	75,98 ± 5,87	94,18 ± 7,51
7	luční (květový)	18,57 ± 1,25	44,05 ± 3,37
8	lesní (květový smíšený)	25,55 ± 2,49	43,59 ± 3,50
9	luční (květový)	74,03 ± 7,54	81,37 ± 6,01
10	lesní	40,43 ± 3,96	37,51 ± 2,53
11	květový smíšený	82,50 ± 5,87	87,90 ± 7,26
12	s tymiánem a bylinami	5,96 ± 3,32	3,65 ± 0,24
13	akátový	-12,16 ± 0,96	47,12 ± 3,62
14	mateří kašička v medu	49,39 ± 4,22	73,56 ± 4,62
15	luční (z lučních květů)	-9,12 ± 0,65	37,45 ± 2,31
16	med z eukalyptových květů	55,36 ± 4,55	53,62 ± 4,72
17	luční	-2,58 ± 0,32	36,45 ± 1,83
18	akátový	44,46 ± 2,46	45,30 ± 2,61
19	med z pomerančových květů	65,76 ± 4,25	60,40 ± 5,82
23	„včelí mystérium“	-34,79 ± 2,21	63,69 ± 6,42
24	pohankový	66,18 ± 3,52	47,36 ± 4,92
25	maliníkový	51,51 ± 5,01	64,05 ± 5,98
26	ostropestřec mariánský	-31,05 ± 2,74	22,67 ± 2,73
27	květový	62,51 ± 4,62	65,54 ± 4,26
28	medovicový	55,41 ± 4,21	59,63 ± 4,28
29	propolis	X	X
30	směs připravená v laboratoři	72,01 ± 4,73	79,20 ± 4,85

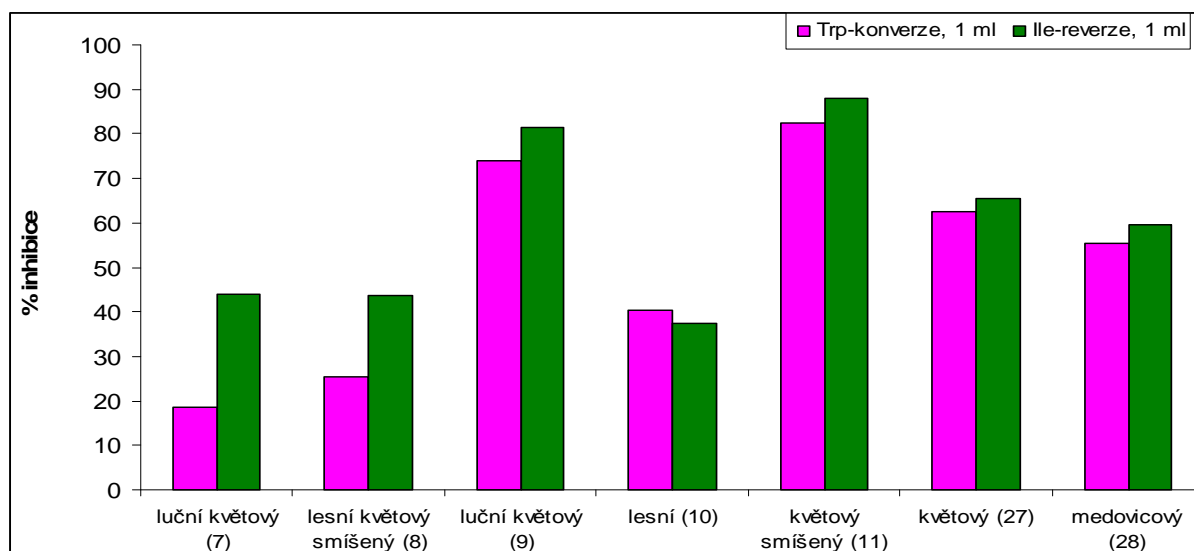
Tab. 14: Antimutagenní účinky medu - *vyšší koncentrace*.

č.	Druh medu	Trp konverze	Ile reverze
1	lipový	23,19 ± 1,17	39,88 ± 2,26
2	květový (šlehaný)	49,35 ± 2,34	64,62 ± 4,38
3	květový (šlehaný)	65,04 ± 4,65	69,2 ± 3,96
4	slunečnicový	30,90 ± 1,76	45,71 ± 3,01
5	řepkový (natural)	49,00 ± 2,99	48,51 ± 3,23
6	řepkový (pastovaný)	87,39 ± 8,05	83,32 ± 6,55
7	luční (květový)	78,26 ± 7,56	82,44 ± 6,31

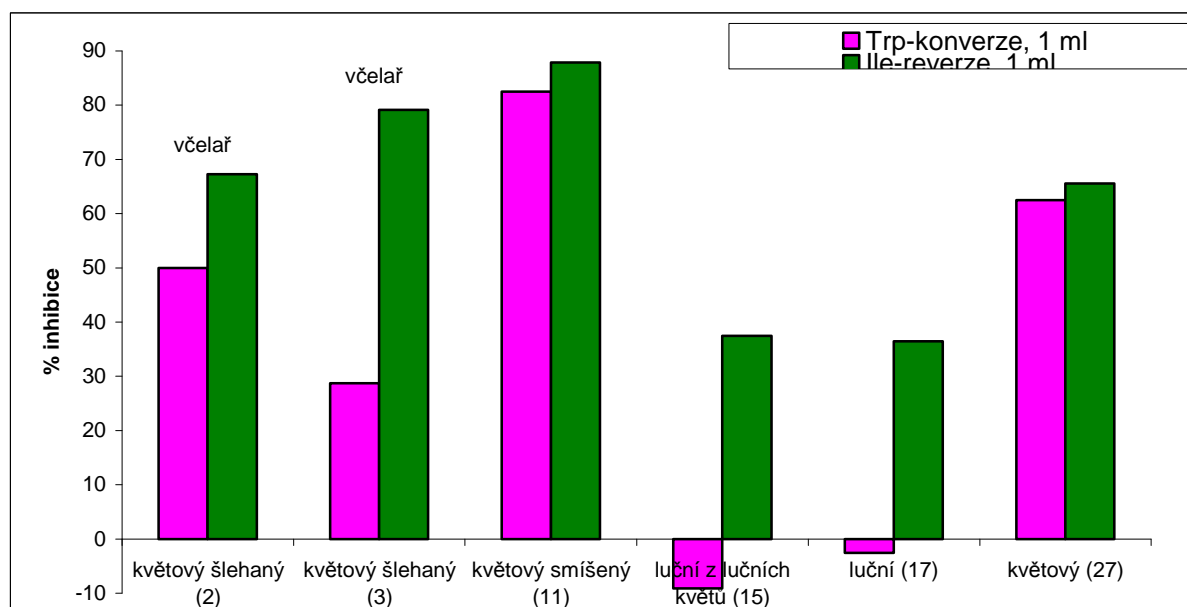
8	lesní (květový smíšený)	45,74 ± 3,95	44,75 ± 4,02
9	luční (květový)	80,09 ± 8,00	83,23 ± 8,09
10	lesní	45,81 ± 3,69	82,51 ± 7,99
11	květový smíšený	75,76 ± 6,81	83,23 ± 7,65
12	s tymiánem a bylinami	15,81 ± 1,33	64,66 ± 6,22
13	akátový	-41,34 ± 3,88	-14,11 ± 1,21
14	mateří kašička v medu	-13,34 ± 1,08	-39,81 ± 2,25
15	luční (z lučních květů)	37,69 ± 3,85	35,42 ± 3,61
16	med z eukalyptových květů	67,55 ± 6,04	50,85 ± 4,35
17	luční	67,92 ± 6,34	75,89 ± 7,59
18	akátový	72,01 ± 7,02	69,18 ± 6,05
19	med z pomerančových květů	65,25 ± 5,67	91,23 ± 8,35
23	„včelí mystérium“	10,95 ± 0,94	43,93 ± 2,86
24	pohankový	50,93 ± 4,25	44,97 ± 2,15
25	maliníkový	63,43 ± 5,87	68,53 ± 6,64
26	ostropestřec mariánský	65,97 ± 6,24	83,17 ± 8,68
27	květový	74,89 ± 6,04	62,45 ± 5,81
28	medovicový	85,71 ± 6, 14	84,16 ± 7,32
29	propolis	X	X
30	směs připravená v laboratoři	39,86 ± 3,01	47,00 ± 4,21



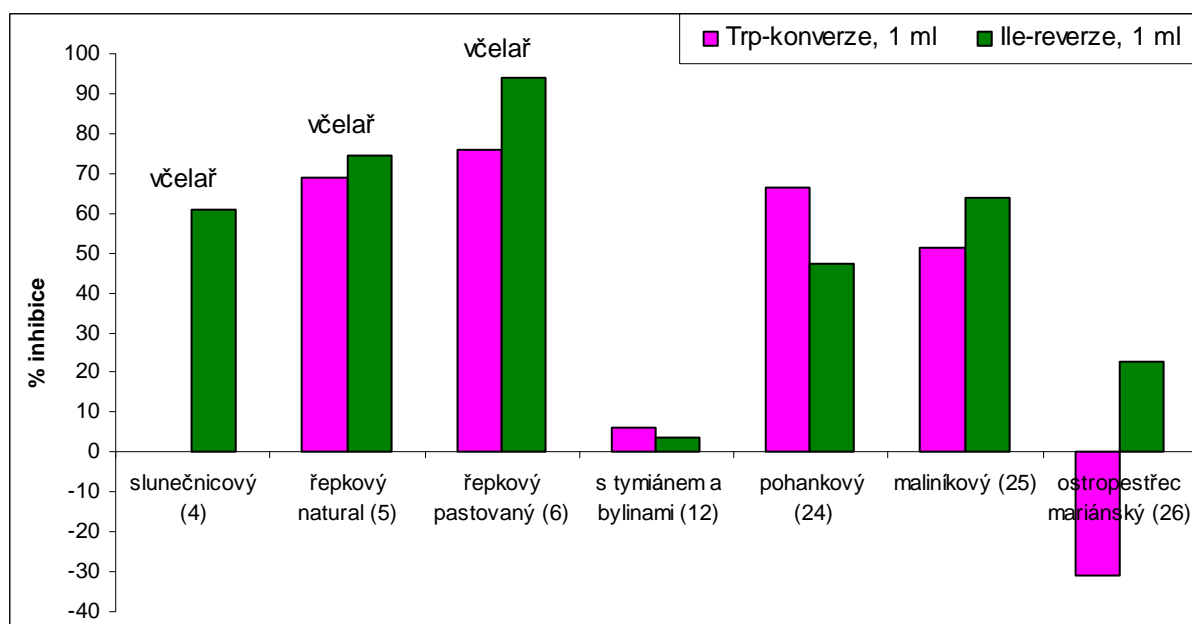
Graf 1: Antimutagenní účinek medů při použití nižší koncentrace roztoků medů (skupina 1).



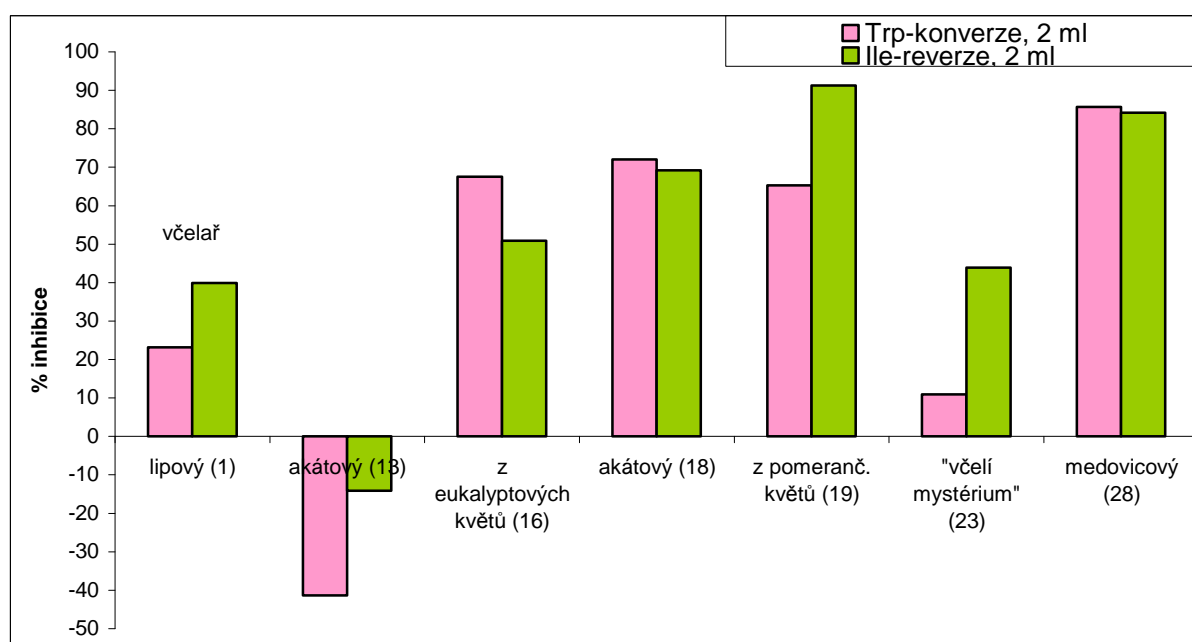
Graf 2: Antimutagenní účinek medů při použití nižší koncentrace roztoků medů (skupina 2).



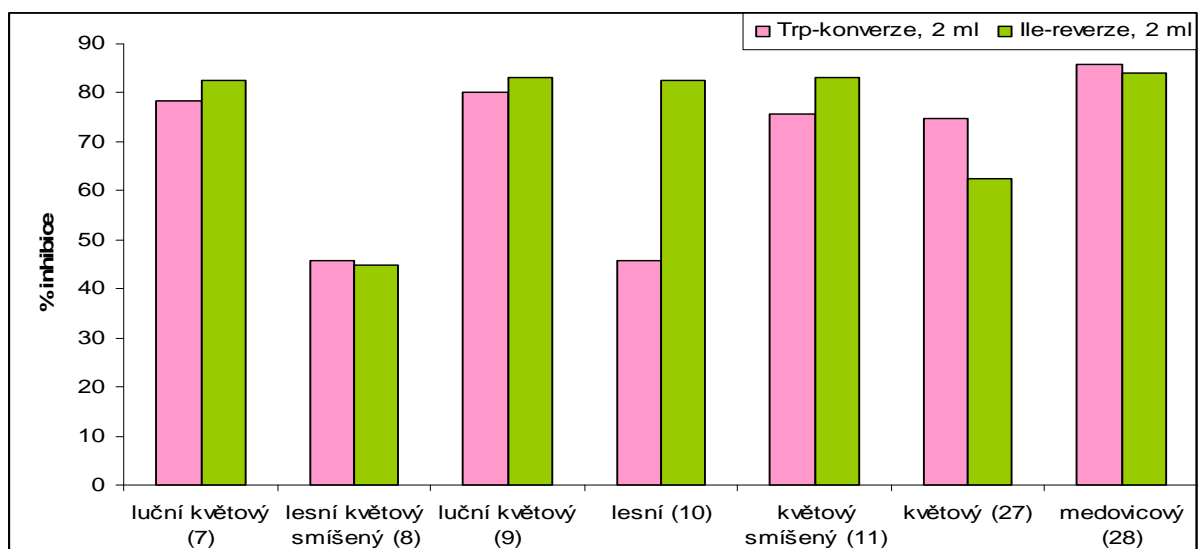
Graf 3: Antimutagenní účinek medů při použití nižší koncentrace roztoků medů (skupina 3).



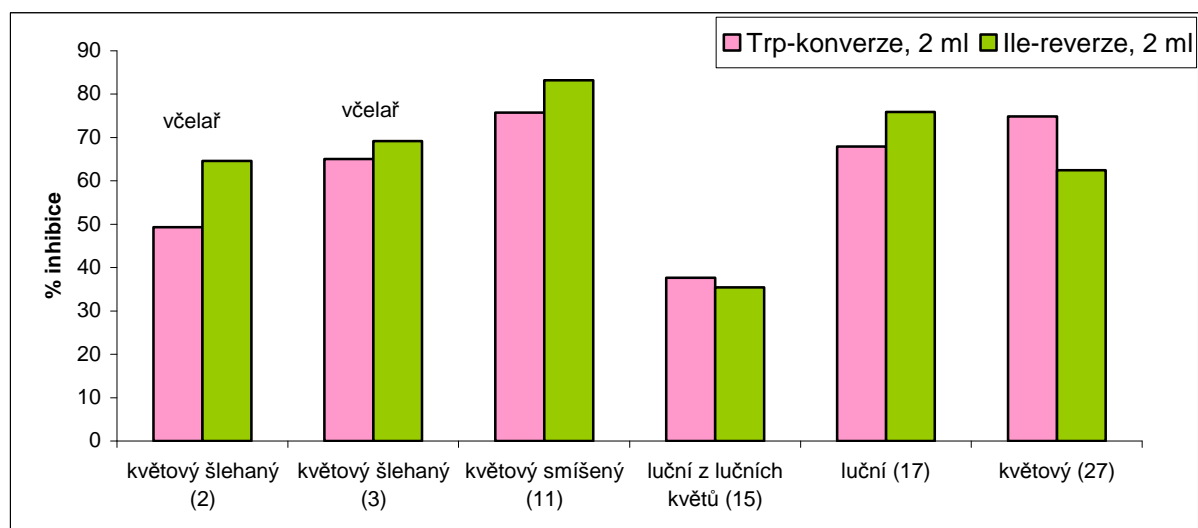
Graf 4: Antimutagenní účinek medů při použití nižší koncentrace roztoků medů (skupina 4).



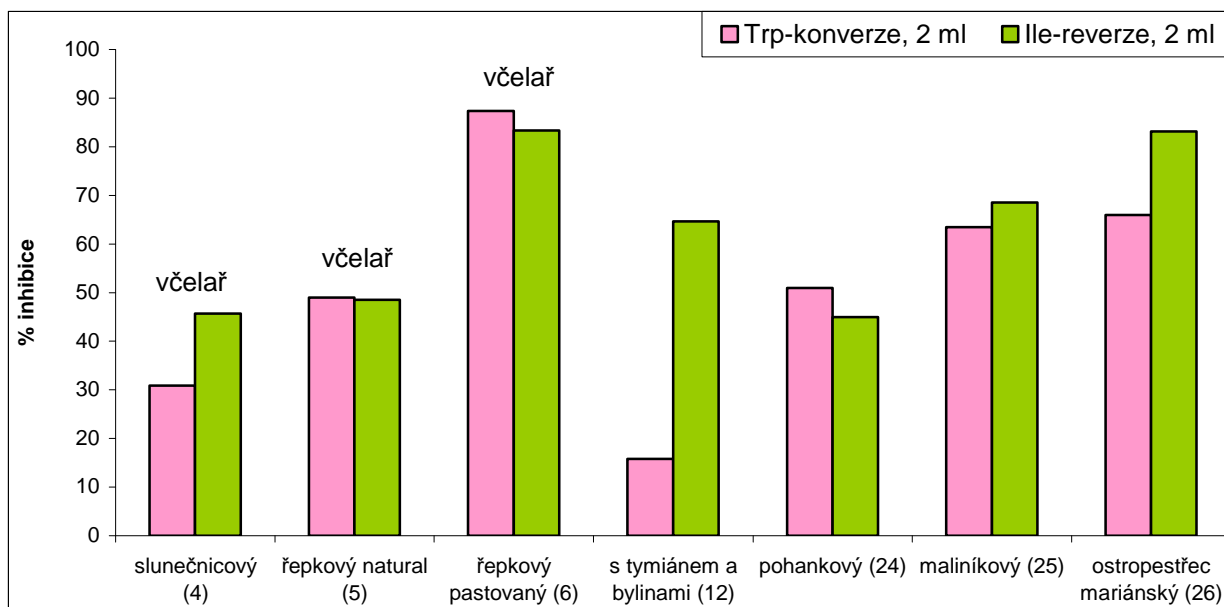
Graf 5: Antimutagenní účinek medů při použití roztoků medů o vyšší koncentraci (skupina 1).



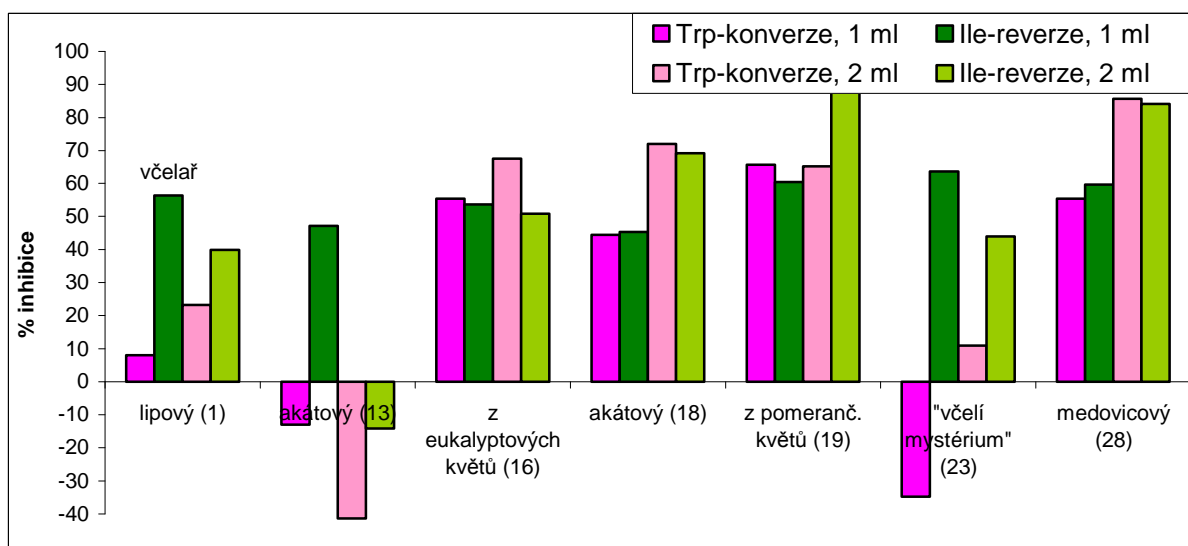
Graf 6: Antimutagenní účinek medů při použití roztoků medů o vyšší koncentraci (skupina 2).



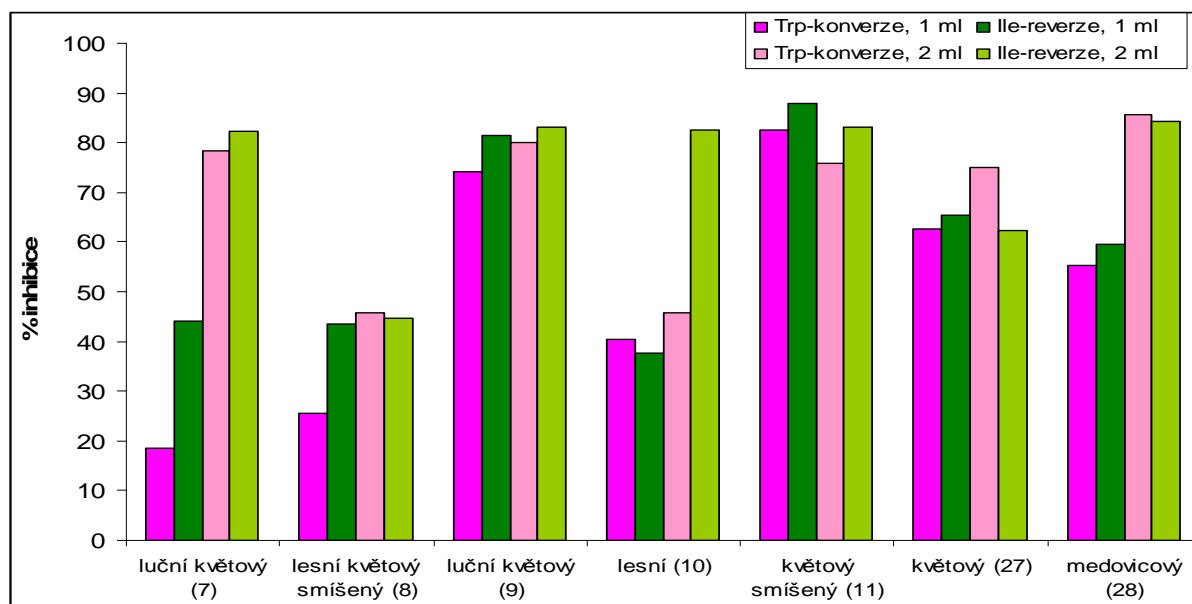
Graf 7: Antimutagenní účinek medů při použití roztoků medů o vyšší koncentraci (skupina 3).



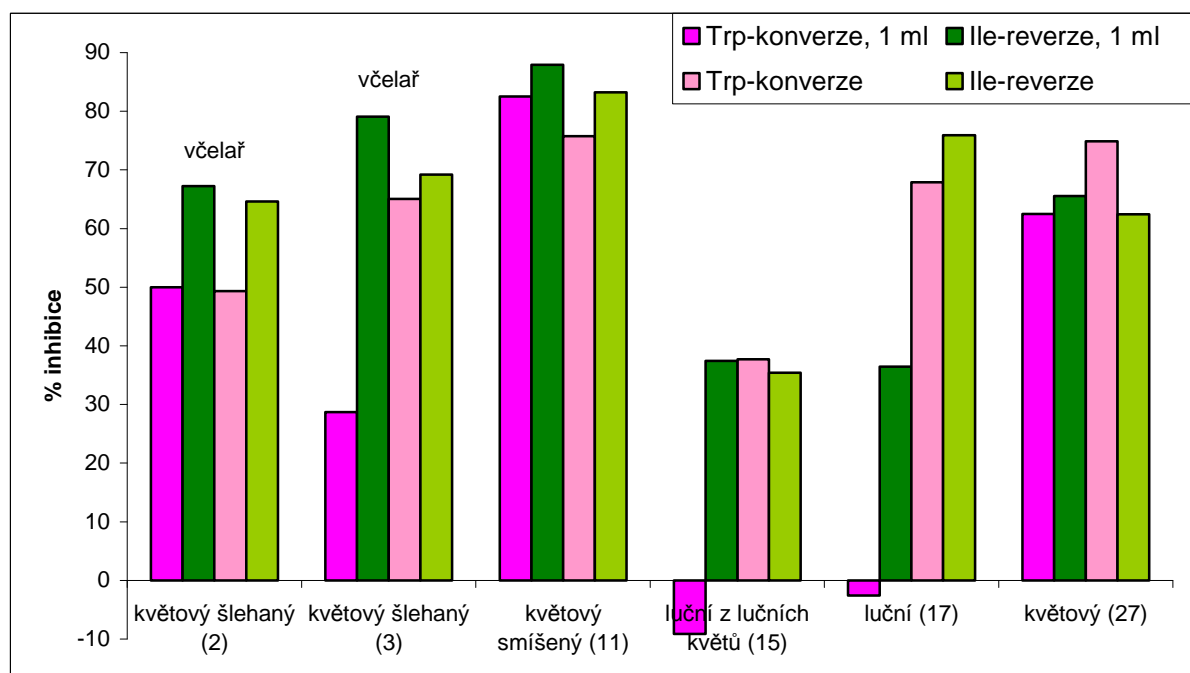
Graf 8: Antimutagenní účinek medů při použití roztoků medů o vyšší koncentraci (skupina 4).



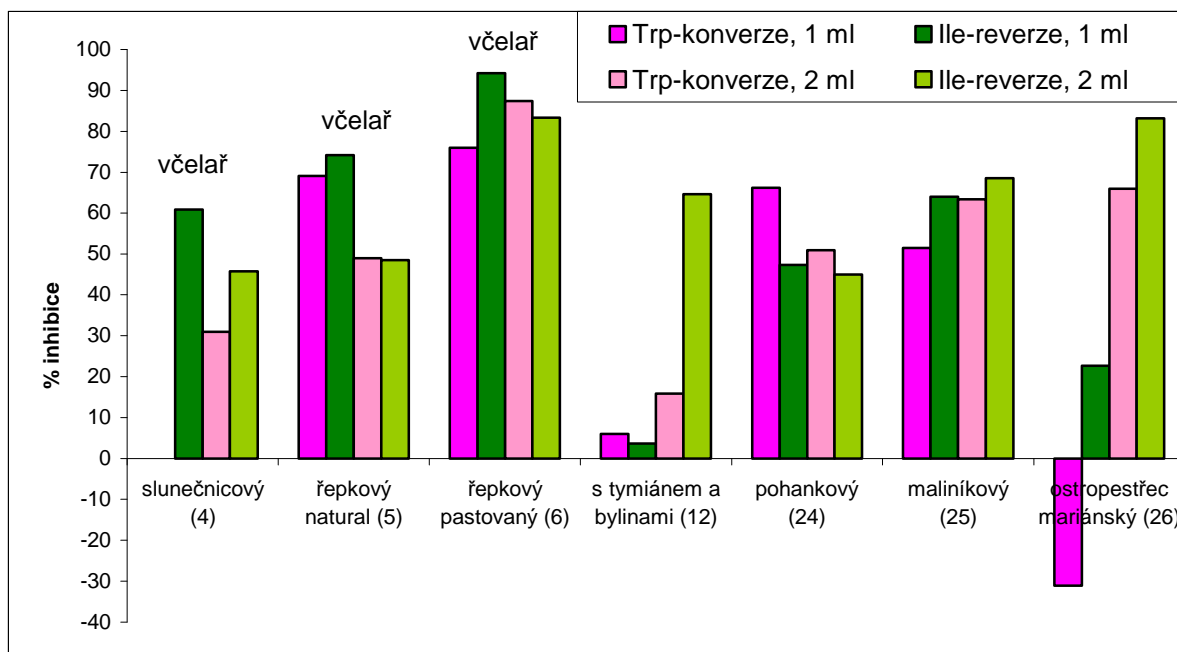
Graf 9: Srovnání antimutagenní aktivity medů pro obě použité koncentrace (skupina 1).



Graf 10: Srovnání antimutagenní aktivity medů pro obě použité koncentrace (skupina 2).



Graf 11: Srovnání antimutagenní aktivity medů pro obě použité koncentrace (skupina 3).



Graf 12: Srovnání antimutagenní aktivity medů pro obě použité koncentrace (skupina 4).

Analýza antimutagenních účinků medů byla provedena s využitím jednoduchého mikrobiálního eukaryotického systému - eukaryotního kmene kvasinky *S. cerevisiae* D7. Testování bylo poněkud komplikováno celkovým složením medů a potenciálním negativním vlivem vysoké osmolarity na testovací kmen, takže bylo třeba nejprve experimentálně ověřit optimální koncentraci vzorků medu vhodnou k testování na uvedeném systému. V tabulkách 13 a 14 jsou uvedeny hodnoty pro dvě z testovaných koncentrací, u nichž byly získány u většiny vzorků reprodukovatelné výsledky. V tabulce 14 jsou výsledky testů s dvojnásobnou koncentrací medu ve srovnání s tabulkou 13. Z uvedených výsledků je patrné, že u některých vzorků medů bylo možné hodnotit antimutagenní efekt až ve vyšší koncentraci (vz. 12, 15, 23, 26), zatímco u jiných typů medů už se projevil negativní efekt vyšší koncentrace medu (př. vz. 5, 14, 30). U poměrně početné skupiny medů nevykazovala zvýšená koncentrace významný vliv na celkovou hodnotu antimutagenity (př. vz. 2, 6, 8, 9, 11, 16, 24, 27). Obecně je u vzorků s nižší hodnotou antimutagenity při nižší koncentraci medu pozorován přírůstek antimutagenity při zvýšení koncentrace medu, pro vyvolání významného antimutagenního efektu je tedy třeba větší množství medu.

Nejvyšší hodnoty antimutagenního účinku a současně nejvyšší stabilita hodnot byla nalezena u více druhů směsných květových medů (vz. 9, 11, 27), u řepkového medu (zejména pastovaného (6)), u medu z eukalyptových (16) a pomerančových květů (19) a u medů maliníkového (25) a medovicového (28) - u všech těchto medů lze očekávat přítomnost řady typů antibakteriálních látek typu silic apod.. Naopak neprůkazné hodnoty či dokonce příspěvek k účinku standardního mutagenu byl prokázán u akátového medu (13), medu s ostropestřcem (26) a u přípravků s mateří kašičkou (vz. 14, 23). U přípravku č.14 je deklarován jako stabilizační činidlo poměrně vysoký obsah kyseliny askorbové (0,8 %), tento přídavek by mohl ovlivnit hodnoty antimutagenní aktivity. Medy získané v obchodní síti vykazovaly většinou nižší hodnoty antimutagenity než medy pořízené u včelaře (grafy 1-12).

6.3. Orientační mikrobiální analýza medů

Povrchová mikroflóra byla stanovována pomocí kitů Merck postupem uvedeným v kapitole 4.3. Vzorky medu byly upraveny a nanášeny na jednorázové testovací médium. Vyhodnocením testů lze získat informace o případné mikrobiální kontaminaci medů bakteriemi nebo houbami.

Tab. 15: Povrchová mikroflóra - stanovení kvasinek/bakterií a plísní (YM(R)).

		strana 1 (bakterie)	strana 2 (kvasinky + plísně)
č.	Druh medu	K/B	plísně
1	lipový	0	0
2	květový (šlehaný)	10 ³	0
3	květový (šlehaný)	0	0
4	slunečnicový	10 ⁴	0
5	řepkový (natural)	0	0
6	řepkový (pastovaný)	0	0
7	luční (květový)	0	0
8	lesní (květový smíšený)	0	0
9	luční (květový)	10 ³	0
10	lesní	0	0
11	květový smíšený	0	0
12	s tymiánem a bylinami	10 ⁷	0
13	akátový	10 ³	10 ³
14	mateří kašička v medu	0	0
15	luční (z lučních květů)	0	0
16	med z eukalyptových květů	0	0
20	luční*	0	0
21	akátový*	0	0
22	med z pomerančových květů*	0	0
23	„včelí mystérium“	0	0
24	pohankový	10 ³	0
25	maliníkový	10 ³	0
26	ostropestřec mariánský	0	0
27	květový	0	0
28	medovicový	0	0
29	propolis	10 ³	0
30	směs připravená v laboratoři	0	0

Kontaminace medů mikroorganismy byla stanovována z toho důvodu, že by mohly být ovlivněny výsledky testů antimutagenity. Z výsledků uvedených v tab. 15 vyplývá, že kontaminace kvasinkami byla prokázána pouze v medu č.13 (akátový). Ze srovnání s výsledky antimutagenity je patrné, že kvasinky přítomné v medu zřejmě interferovaly s testovacím kmene *S.cerevisiae* D7, poněvadž byl zaznamenán u tohoto medu příspěvek

ke genotoxickému efektu standardního mutagenu. Bakteriální kontaminace zanedlaná u některých dalších medů neměla na testy antimutagenity žádný vliv.

6.3 Stanovení aktivních látek v medu

6.3.1 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno pomocí Folin-Ciocalteuovy metody. Detekce byla provedena spektrofotometricky. Obsah celkových polyfenolů byl vypočten s použitím kalibrační závislosti standardu kyseliny gallové. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota těchto tří měření. Směrodatná odchylka byla vypočtena také z těchto tří měření. Analýza byla provedena třikrát, v odstupu 10 a 15 měsíců a výsledky byly srovnány.

Tab. 16: Kalibrační závislost pro výpočet celkových polyfenolů.

	Listopad 2008	Duben 2009
kalibrační závislost	$y = 1,2186 x$	$y = 1,5993 x$
regresní koeficient	$R^2 = 0,9740$	$R^2 = 0,9992$

Tab. 17: Obsah celkových polyfenolů.

č.	Druh medu	Leden 2008 [mg.100g ⁻¹] [47]	Listopad 2008 [mg.100g ⁻¹]	Duben 2009 [mg.100g ⁻¹]
1	lipový	28,77 ± 0,03	19,16 ± 0,20	8,30 ± 0,63
2	květový (šlehaný)	19,87 ± 0,03	10,36 ± 0,01	6,60 ± 0,18
3	květový (šlehaný)	19,21 ± 0,03	15,87 ± 0,02	9,91 ± 0,47
4	slunečnicový	24,66 ± 0,00	18,85 ± 0,24	10,85 ± 0,74
5	řepkový (natural)	12,73 ± 0,02	9,94 ± 0,01	4,09 ± 0,35
6	řepkový (pastovaný)	24,14 ± 0,03	17,95 ± 0,12	7,60 ± 0,98
7	luční (květový)	10,46 ± 0,03	11,01 ± 0,95	6,85 ± 0,58
8	lesní (květový smíšený)	24,11 ± 0,03	15,20 ± 0,13	8,19 ± 0,75
9	luční (květový)	9,89 ± 0,03	8,55 ± 0,65	5,45 ± 0,47
10	lesní	41,29 ± 0,00	23,72 ± 0,12	15,29 ± 1,82
11	květový smíšený	44,32 ± 0,00	25,84 ± 0,87	16,95 ± 1,72
12	s tymiánem a bylinami	23,05 ± 0,06	21,06 ± 0,56	16,45 ± 1,55
13	akátový	19,61 ± 0,00	13,84 ± 1,10	4,70 ± 0,38
14	mateří kašička v medu	61,34 ± 0,03	40,18 ± 2,23	26,27 ± 1,14
15	luční (z lučních květů)	28,09 ± 0,03	21,84 ± 0,03	15,37 ± 1,62
16	med z eukalyptových květů	26,09 ± 0,03	20,01 ± 1,16	14,61 ± 1,62
17	luční	31,17 ± 0,04	15,16 ± 0,38	-
18	akátový	8,51 ± 0,07	5,16 ± 0,21	-
19	med z pomerančových květů	15,25 ± 0,00	9,68 ± 0,05	-
20	luční*	-	-	9,96 ± 0,92
21	akátový*	-	-	3,27 ± 0,55
22	med z pomerančových květů*	-	-	5,72 ± 1,00

23	„včelí mystérium“	24,81 ± 0,00	20,26 ± 1,95	18,31 ± 2,01
24	pohankový	20,12 ± 0,00	24,06 ± 1,60	16,40 ± 1,72
25	maliníkový	18,29 ± 0,03	17,30 ± 1,12	15,90 ± 2,09
26	ostropestřec mariánský	22,88 ± 0,03	15,31 ± 0,96	12,99 ± 1,64
27	květový	27,91 ± 0,03	15,76 ± 1,01	8,10 ± 0,81
28	medovicový	54,41 ± 0,03	26,05 ± 1,12	17,55 ± 0,25
29	propolis	1228,80 ± 6,22	871,24 ± 13,16	756,37 ± 12,96
30	směs připravená v laboratoři	39,87 ± 0,07	19,24 ± 0,66	12,39 ± 1,31

Obsah celkových polyfenolů se pohyboval při stanovení u medů v listopadu 2008 v rozmezí hodnot (5,16 - 40,18) mg.100g⁻¹ medu. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u akátového medu (vzorek 18), nejvyšší u medu s přídavkem mateří kašičky (vzorek 14). Vysoký obsah 26,05 mg celkových polyfenolů.100g⁻¹ medu vykazoval také med medovicový (vzorek 28) a med pohankový 24,06 mg.100g⁻¹ medu (vzorek 24). U vzorku propolisu byl obsah celkových polyfenolů stanoven na 871,24 mg.100g⁻¹. Směs připravená v laboratoři obsahovala 19,24 mg celkových polyfenolů.100g⁻¹ medu, což je v porovnání s obsahem celkových polyfenolů u ostatních medů pouze průměrná hodnota. Akátový med (vz. 13) obsahoval více celkových polyfenolů 13,84 mg.100g⁻¹ medu než akátový med s označením bio 5,16 mg.100g⁻¹ medu (vz. 18).

Analýza v listopadu 2008 a následně v dubnu 2009 prokázala podstatný pokles hodnot celkových polyfenolů o (5,51 - 52,12) %, výsledné hodnoty po 15 měsících uchovávání se pohybovaly v rozmezí hodnot (3,27 - 26,27) mg.100g⁻¹ medu. Nejmenší obsah byl změřen u akátového medu s označením bio (vz. 21), nejvyšší hodnoty u medu s přídavkem mateří kašičky (vz. 14). Vysoký obsah celkových polyfenolů a současně poměrně vysokou stabilitu (druhou nejvyšší, 18,49 %) vykazoval med „včelí mystérium“ 18,31 mg.100g⁻¹ medu (23), dále květový smíšený med (11) 16,95 mg.100g⁻¹ medu, propolis a jednodruhové či exotické medy obsahující specifické přísady - eukalyptový, maliníkový, pohankový med a med s tymiánem a bylinami. U propolisu byl obsah celkových polyfenolů stanoven na 756,37 mg.100g⁻¹. Medovicový med (28) obsahoval 17,55 mg celkových polyfenolů.100g⁻¹ medu, což lze považovat za mírně nadprůměrný obsah; pokles hodnoty za 15 měsíců byl však poměrně značný (13,07 - 76,03%). Některé medy s vyšší či stabilní hodnotou celkových polyfenolů vykazovaly současně vysoký antimutagenní efekt, př. eukalyptový, maliníkový, pohankový a medovicový med.

6.3.2 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno pomocí metody s hlinitou solí. Detekce byla provedena spektrofotometricky. Obsah celkových flavonoidů byl vypočten s použitím kalibrační závislosti standardu katechinu. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota těchto tří měření. Směrodatná odchylka byla vypočtena také z těchto tří měření.

Celkové flavonoidy byly podobně jako celkové polyfenoly analyzovány dvakrát v průběhu diplomové práce, a to v listopadu 2008 a v dubnu 2009. Celkové výsledky byly srovnány s hodnotami z ledna 2008 a jsou souhrnně uvedeny v tabulce 19.

Tab. 18: Kalibrační závislost pro výpočet celkových flavonoidů.

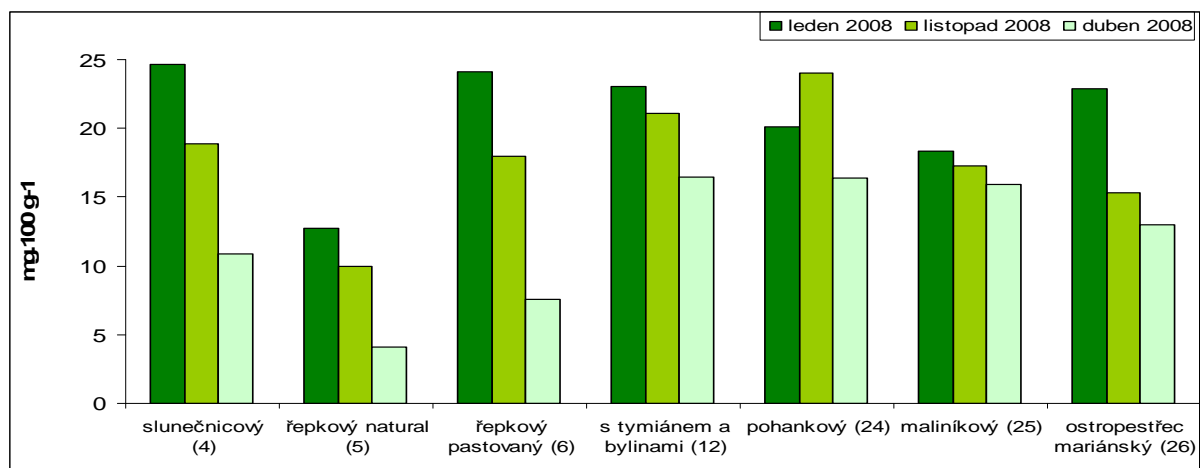
	Listopad 2008	Duben 2009
kalibrační závislost	$y = 2,1381 x$	$y = 3,4752 x$
regresní koeficient	$R^2 = 0,9740$	$R^2 = 0,9999$

Tab. 19: Obsah celkových flavonoidů.

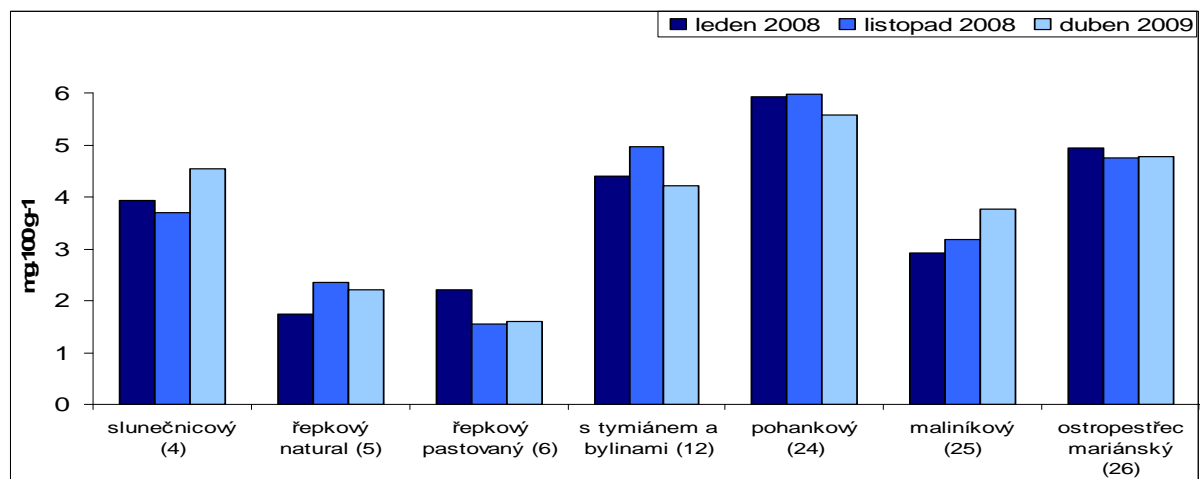
č.	Druh medu	Leden 2008 [mg.100g ⁻¹] [47]	Listopad 2008 [mg.100g ⁻¹]	Duben 2009 [mg.100g ⁻¹]
1	lipový	3,25 ± 0,03	3,85 ± 0,03	3,95 ± 0,29
2	květový (šlehaný)	1,93 ± 0,03	2,14 ± 0,01	2,26 ± 0,07
3	květový (šlehaný)	1,48 ± 0,00	2,06 ± 0,01	2,63 ± 0,20
4	slunečnicový	3,92 ± 0,04	3,69 ± 0,11	4,55 ± 0,20
5	řepkový (natural)	1,73 ± 0,03	2,36 ± 0,06	2,22 ± 0,26
6	řepkový (pastovaný)	2,20 ± 0,03	1,56 ± 0,08	1,59 ± 0,08
7	luční (květový)	1,32 ± 0,03	1,01 ± 0,09	1,18 ± 0,03
8	lesní (květový smíšený)	1,86 ± 0,07	2,25 ± 0,02	2,47 ± 0,05
9	luční (květový)	0,80 ± 0,00	0,68 ± 0,00	1,13 ± 0,04
10	lesní	4,60 ± 0,04	4,59 ± 0,01	4,50 ± 0,21
11	květový smíšený	4,22 ± 0,03	4,35 ± 0,05	3,81 ± 0,33
12	s tymiánem a bylinami	4,39 ± 0,03	4,97 ± 0,12	4,21 ± 0,54
13	akátový	0,83 ± 0,03	1,15 ± 0,03	1,37 ± 0,06
14	mateří kašička v medu	4,94 ± 0,10	3,68 ± 0,20	5,64 ± 0,43
15	luční (z lučních květů)	2,90 ± 0,00	2,27 ± 0,24	3,41 ± 0,01
16	med z eukalyptových květů	5,97 ± 0,06	5,36 ± 0,30	6,10 ± 0,14
17	luční	5,82 ± 0,08	3,21 ± 0,07	-
18	akátový	0,75 ± 0,03	0,56 ± 0,00	-
19	med z pomerančových květů	2,07 ± 0,03	1,96 ± 0,03	-
20	luční*	-	-	2,85 ± 0,06
21	akátový*	-	-	1,50 ± 0,16
22	med z pomerančových květů*	-	-	2,37 ± 0,16
23	„včelí mystérium“	4,47 ± 0,00	4,23 ± 0,05	4,89 ± 0,45
24	pohankový	5,93 ± 0,00	5,98 ± 0,08	5,58 ± 0,13
25	maliníkový	2,91 ± 0,03	3,18 ± 0,09	3,77 ± 0,12
26	ostropestřec mariánský	4,94 ± 0,03	4,75 ± 0,21	4,78 ± 0,32
27	květový	2,94 ± 0,00	2,91 ± 0,17	2,76 ± 0,17
28	medovicový	6,04 ± 0,04	5,89 ± 0,16	5,39 ± 0,12
29	propolis	497,76 ± 1,27	636,29 ± 3,58	648,02 ± 151,26
30	směs připravená v laboratoři	3,19 ± 0,03	3,24 ± 0,03	3,32 ± 0,28

Tab. 20: Procentuální vyjádření obsahu celkových flavonoidů v celkových polyfenolech.

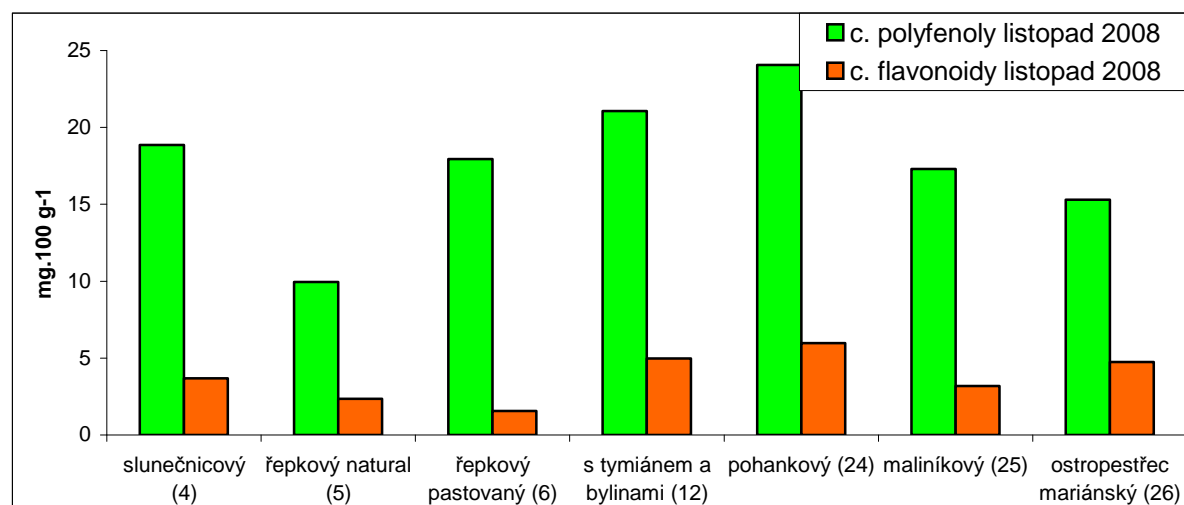
č.	Druh medu	Leden 2008 [mg.100g ⁻¹] [47]	Listopad 2008 [mg.100g ⁻¹]	Duben 2009 [mg.100g ⁻¹]
1	lipový	11,30	20,09	47,59
2	květový (šlehaný)	9,71	20,66	34,24
3	květový (šlehaný)	7,70	12,98	26,54
4	slunečnicový	15,90	19,58	41,94
5	řepkový (natural)	13,59	23,74	54,28
6	řepkový (pastovaný)	9,11	8,69	20,92
7	luční (květový)	12,62	9,17	17,23
8	lesní (květový smíšený)	7,71	14,80	30,16
9	luční (květový)	8,09	7,95	20,73
10	lesní	11,14	19,35	29,43
11	květový smíšený	9,52	16,83	22,48
12	s tymiánem a bylinami	19,05	23,6	25,59
13	akátový	4,23	8,31	29,15
14	mateří kašička v medu	8,05	9,16	21,47
15	luční (z lučních květů)	10,32	10,39	22,19
16	med z eukalyptových květů	22,88	26,79	41,75
17	luční	18,67	21,17	-
18	akátový	8,81	10,85	-
19	med z pomerančových květů	13,57	20,25	-
20	luční*	-	-	28,61
21	akátový*	-	-	45,87
22	med z pomerančových květů*	-	-	41,43
23	„včelí mystérium“	18,02	20,88	26,71
24	pohankový	29,47	24,85	34,02
25	maliníkový	15,91	19,38	23,71
26	ostropestřec mariánský	21,59	31,03	36,80
27	květový	10,53	18,46	34,07
28	medovicový	11,10	22,61	30,71
29	propolis	40,51	73,03	85,68
30	směs připravená v laboratoři	8,00	16,84	26,80



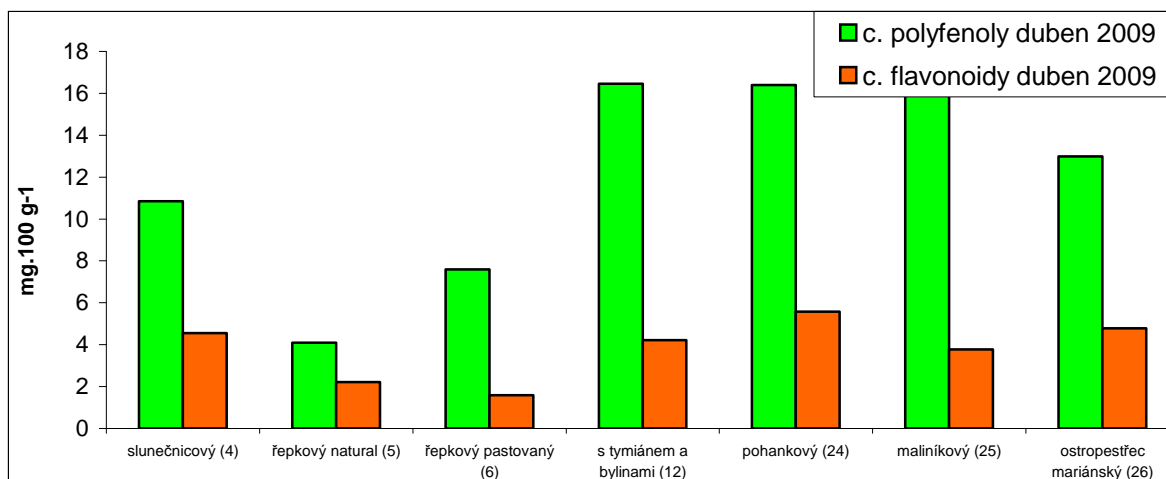
Graf 13: Hodnoty celkových polyfenolů u vybraných vzorků medů v lednu 2008, v listopadu 2008 a dubnu 2009 (skupina 4).



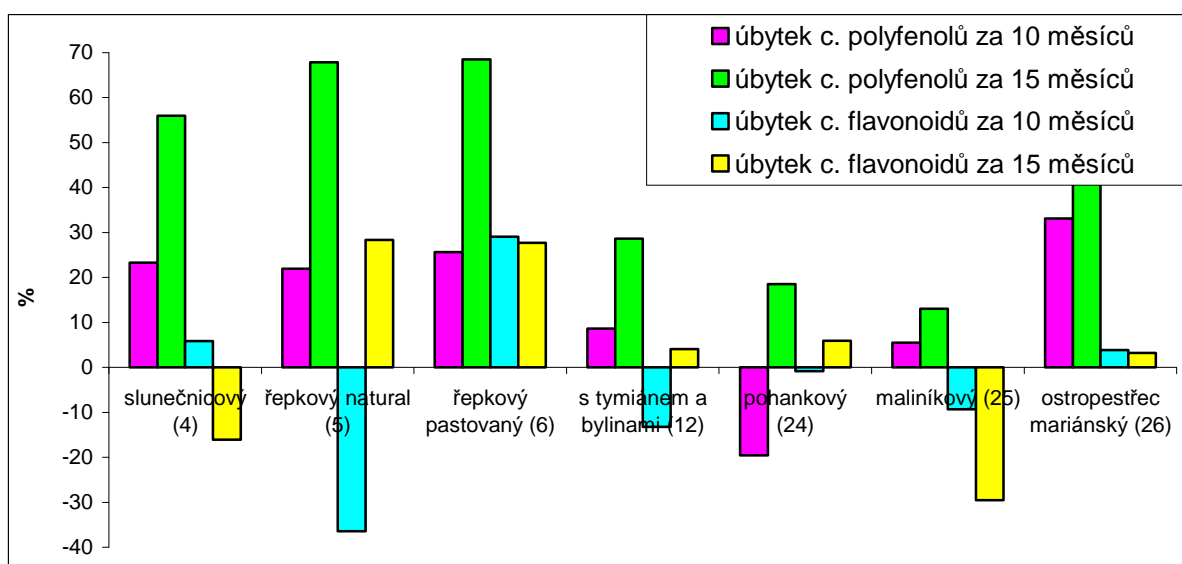
Graf 14: Hodnoty celkových flavonoidů u vybraných vzorků medů (skupina 4) v lednu 2008, listopadu 2008 a dubnu 2009.



Graf 15: Srovnání obsahu celkových polyfenolů a celkových flavonoidů v listopadu 2008.



Graf 16: Srovnání obsahu celkových polyfenolů a celkových flavonoidů ve vzorcích medů analyzovaných v listopadu 2008 a dubnu 2009.



Graf 17: Souhrnný graf pro úbytek celkových polyfenolů a celkových flavonoidů za dobu 10 a 15 měsíců.

Při stanovení celkových flavonoidů v listopadu 2008 se obsah pohyboval v rozmezí hodnot (0,56 - 5,98) mg.100g⁻¹ medu. Nejmenší hodnota byla změřena pro akátový med (18) s označením bio, nejvyšší hodnota pro med pohankový (24). Vysoký obsah celkových flavonoidů byl zjištěn také například u medovicového medu (28) 5,89 mg.100g⁻¹ medu a medu z eukalyptových květů (16) 5,36 mg.100g⁻¹ medu. U vzorku propolisu byl obsah celkových flavonoidů změřen na 636,29 mg.100g⁻¹. Z analyzovaných bio medů vykazoval nejvyšší obsah celkových flavonoidů právě med z eukalyptových květů. Med akátový s označením bio (13) obsahoval méně celkových flavonoidů, než med bez tohoto označení (13), 1,15 mg.100g⁻¹ medu. Z medů zakoupených přímo u včelaře vykazoval nejvyšší hodnoty med lipový, 3,85 mg.100g⁻¹ medu (1).

Hodnoty celkových flavonoidů se v dubnu 2009 pohybovaly v rozmezí (1,13 - 6,10) mg.100g⁻¹ medu. Nejnižší obsah vykazoval med luční květový (9), nejvyšší med z eukalyptových květů (16). Srovnáním s hodnotami získanými v předchozí práci v lednu

2008 [47] je patrné, že u většiny medů se hodnota celkových flavonoidů prakticky nezměnila, u některých medů došlo k mírnému poklesu (např. vzorky 6, 7, 11, 28), zatímco řada medů vykazovala dokonce vyšší hodnotu (př. 3, 8, 13, 29). To může být způsobeno jednak nepřesností samotné kolorimetrické metody, ale u některých medů mohlo dojít i k uvolnění flavonoidů z vázaných forem. Hodnoty celkových flavonoidů tedy nevykazují zdaleka tak významné změny, jako hodnoty polyfenolů. To může být způsobeno skutečností, že parametr celkové polyfenoly zahrnuje podstatně širší spektrum látek s pozitivním i negativním účinkem, které se v průběhu uchovávání medu mohou různě měnit, rozkládat či tvořit v závislosti na druhu medu a způsobu zpracování.

Z tabulky 20 je dále patrné, že flavonoidní látky tvoří poměrně malou část polyfenolických látek obsažených v medech. Procentuální zastoupení flavonoidů v obsahu polyfenolů se pohybovalo při stanovení v lednu 2008 v rozmezí (4,23 - 29,47) %, v listopadu 2008 v rozmezí (7,95 - 31,03) %, přičemž nejméně se flavonoidy na obsahu polyfenolů podílely u medu lučního květového (9). Při stanovení v dubnu 2009 bylo rozmezí obsahu flavonoidů v celkovém množství polyfenolů (17,23 - 54,28) %. Tato skutečnost podporuje předchozí zjištění ohledně změn obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů v medu.

Tab. 21: Úbytek celkových polyfenolů a celkových flavonoidů během skladování.

č.	Druh medu	Úbytek celkových polyfenolů za 10 měsíců skladování [%]	Úbytek celkových flavonoidů za 10 měsíců skladování [%]	Úbytek celkových polyfenolů za 15 měsíců skladování [%]	Úbytek celkových flavonoidů za 15 měsíců skladování [%]
1	lipový	33,40	-18,46	71,15	-21,54
2	květový (šlehaný)	47,86	-10,88	66,78	-17,10
3	květový (šlehaný)	17,39	-39,19	48,41	-77,70
4	slunečnicový	23,26	5,87	56,00	-16,07
5	řepkový (natural)	21,92	-36,42	67,87	-28,32
6	řepkový (pastovaný)	25,64	29,09	68,52	27,73
7	luční (květový)	-5,26	23,48	34,51	10,61
8	lesní (květový smíšený)	36,96	-20,97	66,03	-32,80
9	luční (květový)	13,55	15,00	44,89	-41,25
10	lesní	42,55	0,22	62,97	2,17
11	květový smíšený	41,70	-3,08	61,76	9,72
12	s tymiánem a bylinami	8,63	-13,21	28,63	4,10
13	akátový	29,42	-38,55	76,03	-65,06
14	mateří kašička v medu	34,50	25,51	57,17	-14,17
15	luční (z lučních květů)	22,25	21,72	45,28	-17,59
16	med z eukalyptových květů	23,30	10,22	44,00	-2,18
17	luční	51,36	44,85	-	-
18	akátový	39,37	25,33	-	-
19	med z pomerančových	36,52	5,31	-	-

	květů				
23	„včelí mystérium“	18,34	5,37	26,20	-9,40
24	pohankový	-19,58	-0,84	18,49	5,90
25	maliníkový	5,51	-9,28	13,07	-29,55
26	ostropestřec mariánský	33,09	3,85	43,23	3,24
27	květový	43,53	1,02	70,98	6,12
28	medovicový	52,12	2,48	67,74	10,76
29	propolis	29,10	-27,83	38,45	-30,19
30	směs připravená v laboratoři	51,74	-1,57	68,92	-4,08

Poznámka pro tabulku 21: - = rozdíl nebyl stanoven, v době analýzy v listopadu 2008 nebyly zakoupeny medy luční*, akátový*, med z pomerančových květů*, v dubnu 2009 již nebyly k dispozici medy luční, akátový, med z pomerančových květů.

Stanovení obsahu celkových polyfenolů a celkových flavonoidů bylo provedeno třikrát, a to s odstupem 10 a 15 měsíců (leden 2008, listopad 2008, duben 2009). Cílem bylo zjistit, zda v průběhu skladování dochází k úbytku aktivních látek - polyfenolů a flavonoidů. V tabulce 21 je zaznamenán úbytek celkových polyfenolů a celkových flavonoidů v procentech, přičemž hodnoty zaznamenané v lednu 2008 představují 100 % a vypočítaná hodnota je procentuální podíl celkových polyfenolů a celkových flavonoidů změřených v listopadu 2008 a v dubnu 2009.

Z tabulky 21 vyplývá, že v průběhu skladování došlo k velkým ztrátám polyfenolických látek, úbytek flavonoidů tak výrazný nebyl. V listopadu 2008, tedy po 10 měsících skladování, byl úbytek celkových polyfenolů v rozmezí (5,51 - 51,36) %. K nejnižším ztrátám došlo u medu maliníkového (25). K nejvyšším ztrátám došlo u medu lučního s označením bio (17). V dubnu 2009 byl celkový úbytek polyfenolů ve srovnání s lednem 2008 zaznamenán v rozsahu (13,07 - 76,03) %. K nejnižším ztrátám došlo stejně jako po 10 měsících u maliníkového medu (25), k největším ztrátám došlo u medu akátového (13).

U celkových flavonoidů došlo v listopadu 2008 ke ztrátám v rozmezí (0,22 - 44,85) %. Nejnižší ztráty byly zaznamenány u medu lesního (10). Nejvyšší ztráty byly změřeny u bio-medu lučního (17), zde také došlo k nejvyšším ztrátám polyfenolů za stejné období, viz výše. Během stanovení v dubnu 2009 byly zaznamenány ztráty v rozmezí (2,17 - 27,73) %. K nejmenším ztrátám došlo u lesního medu (10), k nejvyšším u řepkového pastovaného medu (6).

U propolisu byly ztráty celkových polyfenolů 29,10 % (10 měsíců) a 38,45 % (15 měsíců), u obsahu celkových flavonoidů byl naopak zaznamenán přírůstek, za období 10 měsíců o 27,83 % a za 15 měsíců o 30,19 %.

Ze srovnání hodnot celkových polyfenolů a celkových flavonoidů s hodnotami antimutagenní aktivity vyplývá, že většina medů s vysokou hodnotu antimutagenity obsahuje vyšší obsah polyfenolů a zejména flavonoidů. Výjimkou je med s tymiánem a bylinami (12), který vykazuje výrazně nízké hodnoty antimutagenity a přitom vysoké hodnoty polyfenolických látek. Nejlépe si odpovídají příslušné hodnoty u medu medovicového (28), eukalyptového (16), řepkového (6), pohankového (24) a maliníkového (25) a rovněž u většiny kvalitnějších směsných květových medů. Mezi hodnotami diskutovaných parametrů nebyla však prokázána žádná korelace, což zřejmě souvisí s tím, že jde vesměs o skupinové parametry, k jejichž hodnotě přispívá řada faktorů.

6.3.3 Stanovení celkové antioxidační kapacity pomocí ABTS

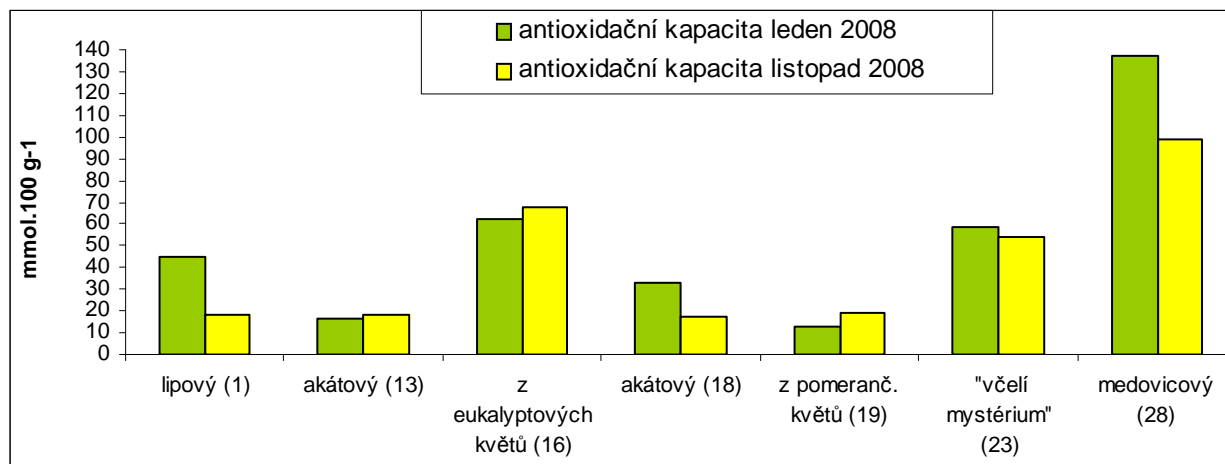
Celková antioxidační aktivita byla proměřena pomocí soupravy Total Antioxidant Status kit od firmy Randox. Metoda je založena na principu zhášení barevného radikálového kationu antioxidantem. Koncentrace produktu radikálové reakce byla měřena spektrofotometricky. Naměřené absorbance byly dosazeny do rovnice (kap. 4.4.3), z ní byla vypočtena celková antioxidační kapacita jednotlivých vzorků. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota těchto tří měření. Směrodatná odchylka byla vypočtena také z těchto tří měření.

Hodnota TAS byla měřena v medech pouze jednou v průběhu diplomové práce, a to v listopadu 2008. V tab. 22 jsou uvedeny získané hodnoty ve srovnání s výsledky získanými v předchozí práci v lednu 2008 [47].

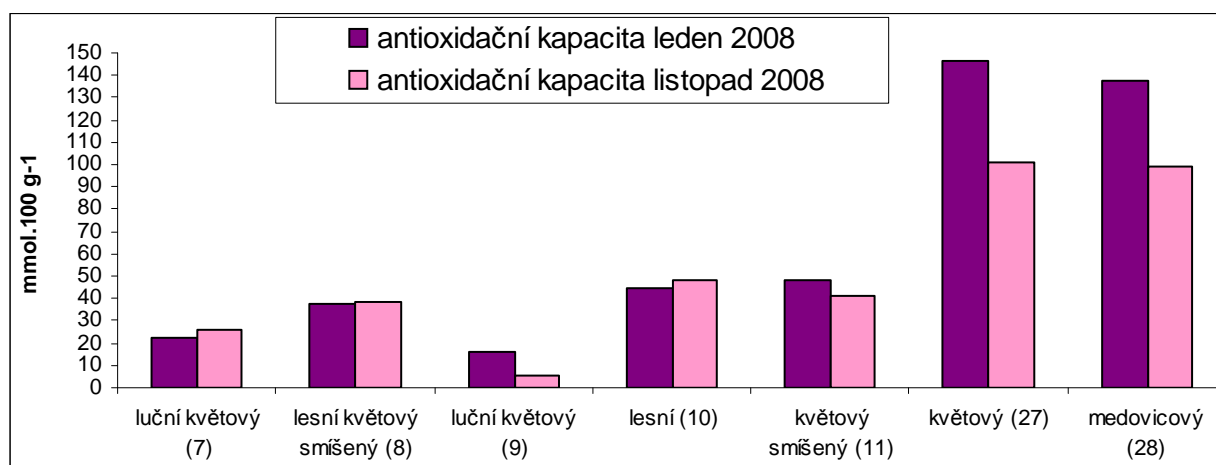
Tab. 22: Stanovení celkové antioxidační kapacity pomocí ABTS

č.	Druh medu	Antioxidační kapacita [mmol.100 g ⁻¹] leden 2008 [47]	Antioxidační kapacita [mmol.100 g ⁻¹] listopad 2008	úbytek za 10 měsíců [%]
1	lipový	45,01 ± 0,51	18,38 ± 0,35	59,16
2	květový (šlehaný)	26,86 ± 0,38	29,88 ± 0,31	-11,24
3	květový (šlehaný)	51,34 ± 0,61	42,05 ± 0,56	18,10
4	slunečnicový	55,76 ± 0,58	64,70 ± 0,53	-16,03
5	řepkový (natural)	16,51 ± 0,31	10,66 ± 0,09	35,43
6	řepkový (pastovaný)	40,23 ± 0,50	32,74 ± 0,28	18,62
7	luční (květový)	22,31 ± 0,35	25,96 ± 0,23	-16,36
8	lesní (květový smíšený)	37,84 ± 0,49	38,42 ± 0,41	-1,53
9	luční (květový)	16,20 ± 0,30	5,46 ± 0,43	66,30
10	lesní	44,61 ± 0,48	47,89 ± 0,46	-7,35
11	květový smíšený	48,15 ± 0,50	40,94 ± 0,28	14,97
12	s tymiánem a bylinami	55,04 ± 0,58	63,93 ± 0,53	-16,15
13	akátový	16,73 ± 0,32	18,73 ± 0,13	-11,95
14	mateří kašička v medu	3118,93 ± 11,02	1075,30 ± 9,66	65,52
15	luční (z lučních květů)	21,99 ± 0,34	21,00 ± 0,17	4,50
16	med z eukalyptových květů	62,14 ± 0,67	67,73 ± 0,49	-9,00
17	luční	47,09 ± 0,44	46,41 ± 0,37	1,44
18	akátový	33,28 ± 0,45	17,70 ± 0,18	46,81
19	med z pomerančových květů	12,75 ± 0,29	19,63 ± 0,22	-53,96
23	„včelí mystérium“	58,68 ± 0,59	53,79 ± 0,56	8,33
24	pohankový	58,63 ± 0,55	58,83 ± 0,50	-0,34
25	maliníkový	40,20 ± 0,42	34,76 ± 0,27	13,53
26	ostropestřec mariánský	60,31 ± 0,60	66,32 ± 0,67	-9,97
27	květový	146,68 ± 1,28	100,96 ± 0,95	31,17
28	medovicový	137,49 ± 1,16	98,96 ± 0,87	28,02

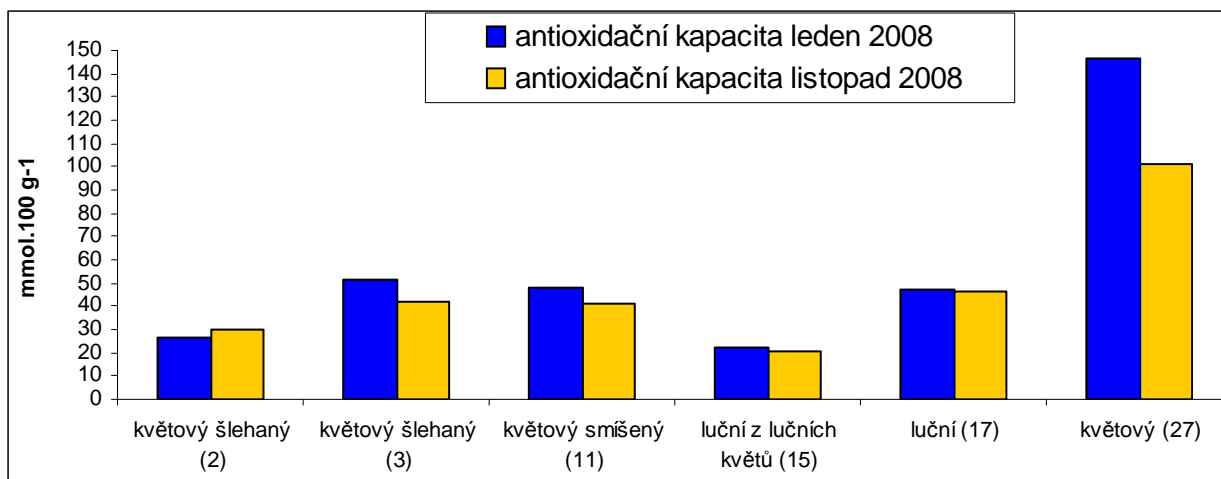
29	propolis	$57355,93 \pm 300,42$	$22\,235,18 \pm 126,84$	61,23
30	směs připravená v laboratoři	$122,46 \pm 1,06$	$45,47 \pm 0,44$	62,87



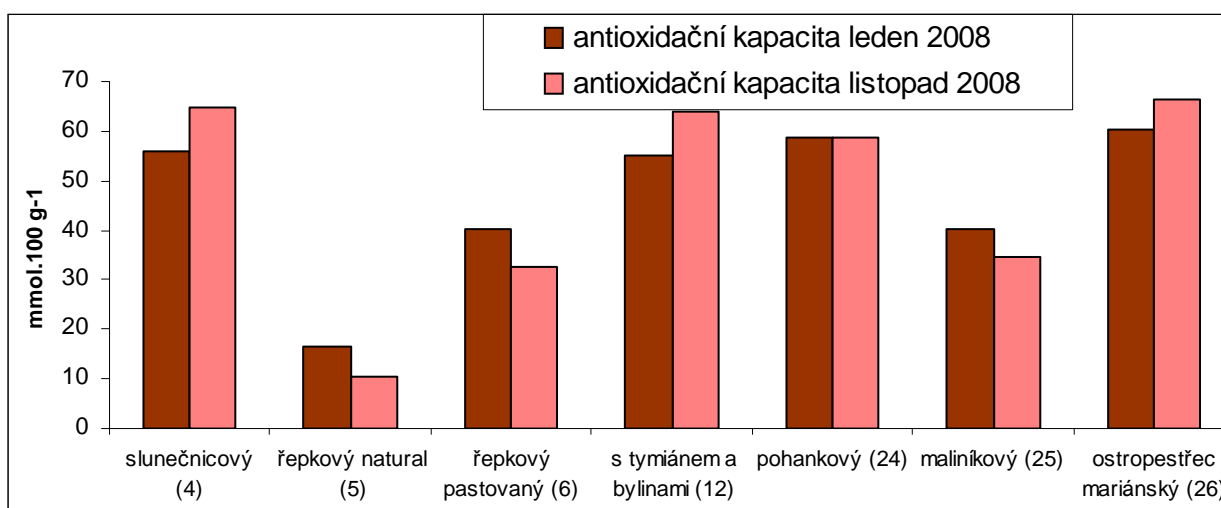
Graf 18: Hodnoty celkové antioxidační kapacity u vybraných vzorků medů (skupina 1).



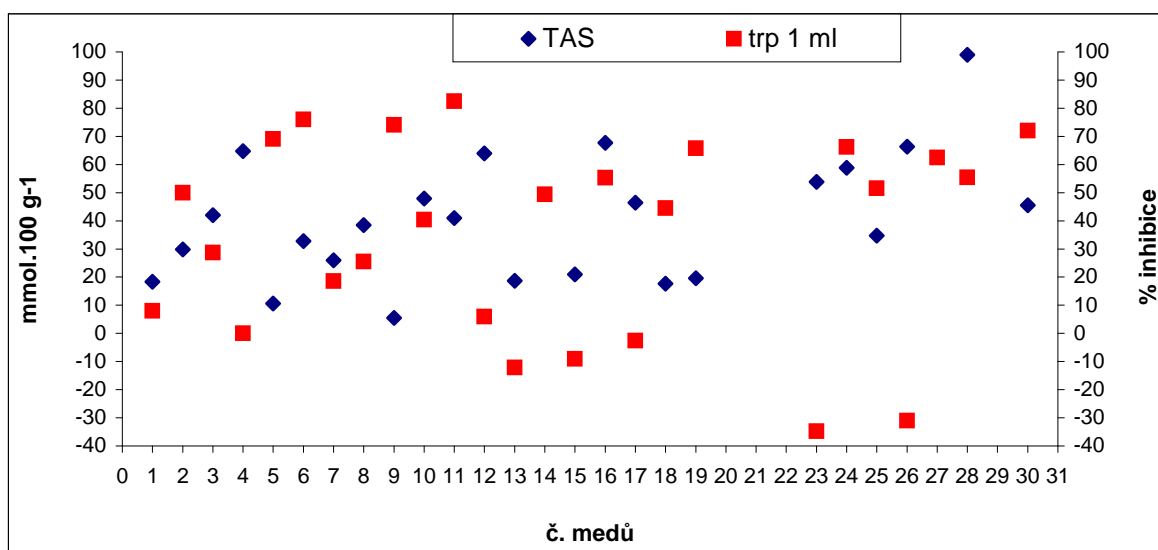
Graf 19: Hodnoty celkové antioxidační kapacity u vybraných vzorků medů (skupina 2).



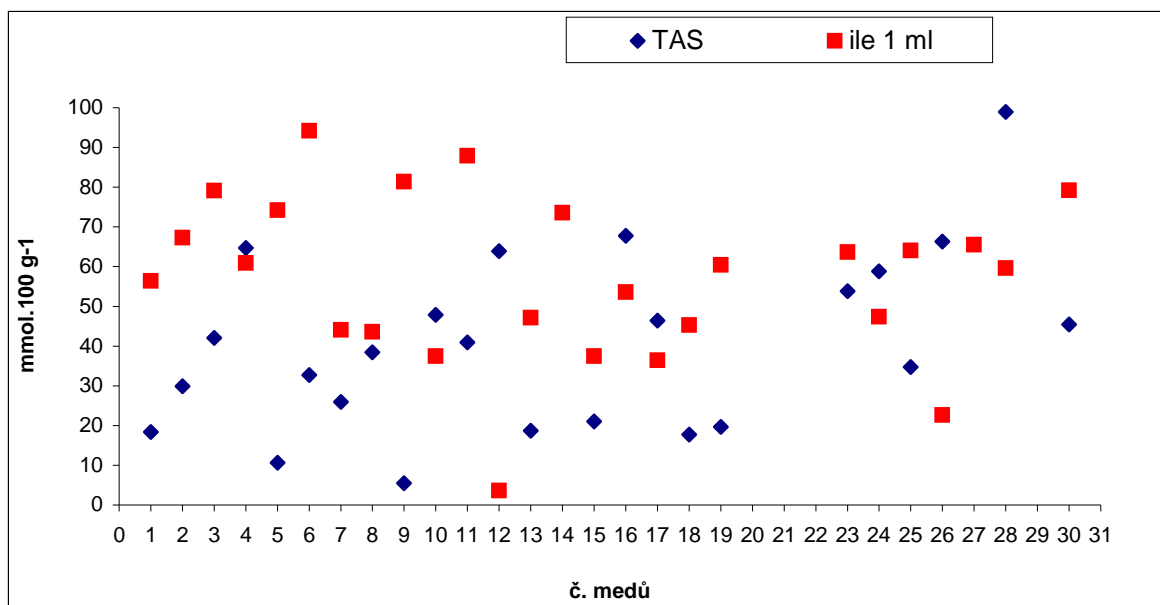
Graf 20: Celková antioxidační kapacita u vybraných druhů medů (skupina 3).



Graf 21: Hodnoty antioxidační kapacity u vybraných vzorků medů (skupina 4).



Graf 22: Srovnání hodnot celkové antioxidační kapacity a antimutagenních účinků medů.



Graf 23: Srovnání hodnot celkové antioxidační kapacity a antimutagenních účinků medů.

Vysvětlivky pro grafy 22 a 23: - TAS - Total Antioxidant Status = celková antioxidační kapacita měřená v listopadu 2008, hlavní osa y

- trp 1 ml = Trp-konverze pro nižší koncentraci roztoku medu
- ile 1 ml = Ile-reverze pro nižší koncentraci
- vedlejší osa y

Celková antioxidační kapacita medů se pohybovala v rozmezí (5,46 - 100,96) mmol.100 g⁻¹ medu. Nejnížší kapacitu vykazoval med luční květový (9), naopak nejvyšší hodnotu vykazoval med květový (27). Vysoké hodnoty antioxidační kapacity vykazoval také med z eukalyptových květů (16), s ostropestřcem mariánským (26), slunečnicový (4), s tymiánem a bylinami (12) a med pohankový (24), vesměs medy s vyššími hladinami flavonoidů i polyfenolů. Na základě získaných výsledků lze usoudit, že jednodruhové medy vykazují většinou vyšší antioxidační kapacitu než medy směsné. U vzorku propolisu byla hodnota stanovena na 22 235 mmol.100 g⁻¹. U směsi připravené v laboratoři byla naměřena antioxidační kapacita 45,47 mmol.100 g⁻¹ medu. U medovicového medu (28) byla hodnota stanovena na 98,96 mmol.100 g⁻¹ medu. Med s přídatkem mateří kašičky (14) má na obale deklarován také přídatek kyseliny askorbové jako konzervantu v množství 0,8 %. Tento přídatek se na hodnotě antioxidační kapacity poměrně významně projevil (do intervalu hodnot nebyl proto zařazen).

Ze srovnání hodnot TAS v medech v průběhu 10 měsíců uchovávání vyplývá, že u většiny medů došlo spíše k poklesu hodnot TAS (př. med lipový (1), luční květový med (9)), i když u některých vzorků byly získány i mírně vyšší hodnoty (dáno významnou citlivostí metody a možnými odchylkami v průběhu zpracování vzorků a analýzy), př. slunečnicový med (4). Zajímavé je, že vzorky s vysokou stabilitou TAS a s vyšší celkovou hodnotou vykazují i vyšší antimutagenní účinek a současně vyšší hodnoty celkových flavonoidů (př. řepkový pastovaný med (6), luční květové směsné medy, eukalyptový med (16), maliníkový (26) a medovicový med (28). Neplatí však korelace mezi hodnotami TAS a antimutagenity, oba parametry jsou výsledkem příspěvku řady látek, které se mohou značně ovlivňovat. Hladiny TAS rovněž nevykazují korelaci s hodnotami celkových polyfenolů a flavonoidů.

6.3.4 Stanovení kyseliny askorbové

Kyselina askorbová byla stanovena titračně. Vzorek medu rozpuštěný v 2% HCl byl titrován roztokem 2,6-dichlorindofenolu. Obsah kyseliny askorbové byl vypočten s použitím kalibrační závislosti standardu kyseliny L-askorbové. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota těchto tří měření. Směrodatná odchylka byla vypočtena také z těchto tří měření.

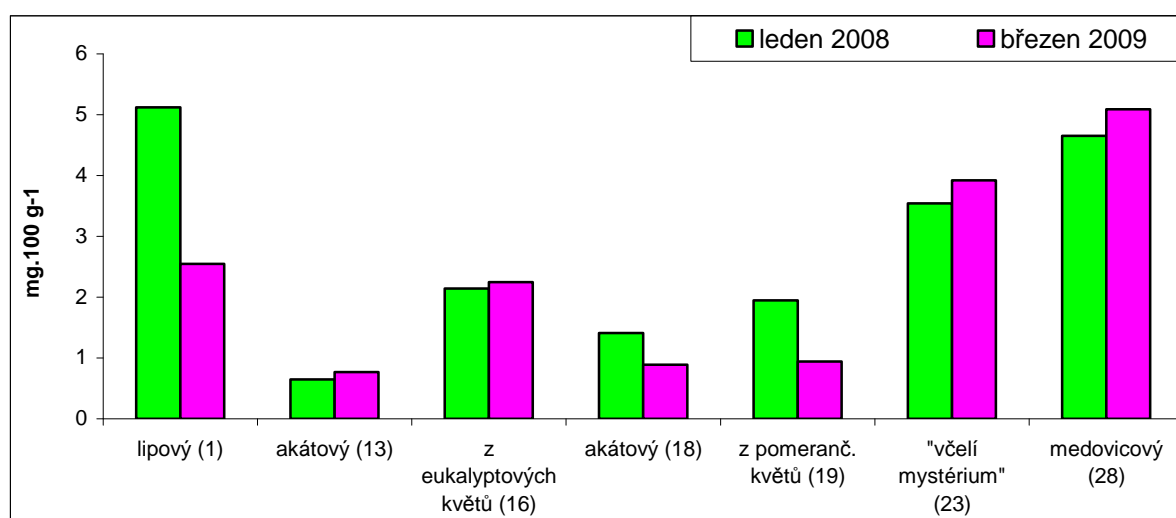
Tab. 23: Stanovení obsahu kyseliny askorbové.

č.	Druh medu	Obsah kyseliny askorbové [mg.100 g ⁻¹] leden 2008 [47]	Obsah kyseliny askorbové [mg.100 g ⁻¹] březen 2009	úbytek za 14 měsíců [%]
1	lipový	5,12 ± 0,09	2,55 ± 0,28	50,14
2	květový (šlehaný)	2,48 ± 0,22	1,28 ± 0,21	48,27
3	květový (šlehaný)	2,98 ± 0,08	2,38 ± 0,00	20,24
4	slunečnicový	3,62 ± 0,15	2,98 ± 0,07	17,56
5	řepkový (natural)	2,17 ± 0,17	1,37 ± 0,14	36,97
6	řepkový (pastovaný)	1,74 ± 0,19	1,37 ± 0,14	21,51
7	luční (květový)	2,37 ± 0,15	2,25 ± 0,26	5,05
8	lesní (květový smíšený)	2,02 ± 0,13	2,56 ± 0,28	-26,80
9	luční (květový)	1,44 ± 0,07	1,38 ± 0,02	4,15
10	lesní	2,81 ± 0,14	2,70 ± 0,38	3,85
11	květový smíšený	4,55 ± 0,19	4,99 ± 0,15	-9,61
12	s tymiánem a bylinami	4,11 ± 0,07	4,92 ± 0,11	-19,74
13	akátový	0,65 ± 0,04	0,77 ± 0,07	-18,27
14	mateří kašička v medu	572,77 ± 12,07	532,73 ± 1,28	6,99
15	luční (z lučních květů)	2,40 ± 0,06	2,58 ± 0,14	-7,50
16	med z eukalyptových květů	2,14 ± 0,04	2,25 ± 0,11	-5,20
17	luční	2,62 ± 0,16	1,70 ± 0,09	
18	akátový	1,41 ± 0,17	0,89 ± 0,13	
19	med z pomerančových květů	1,95 ± 0,18	0,94 ± 0,09	
20	luční*	-	2,61 ± 0,15	0,42
21	akátový*	-	0,50 ± 0,00	64,51
22	med z pomerančových květů*	-	2,42 ± 0,81	-24,06
23	„včelí mystérium“	3,54 ± 0,04	3,92 ± 0,07	-10,85
24	pohankový	5,34 ± 0,13	6,86 ± 0,50	-28,46
25	maliníkový	3,00 ± 0,08	3,06 ± 0,14	-2,10

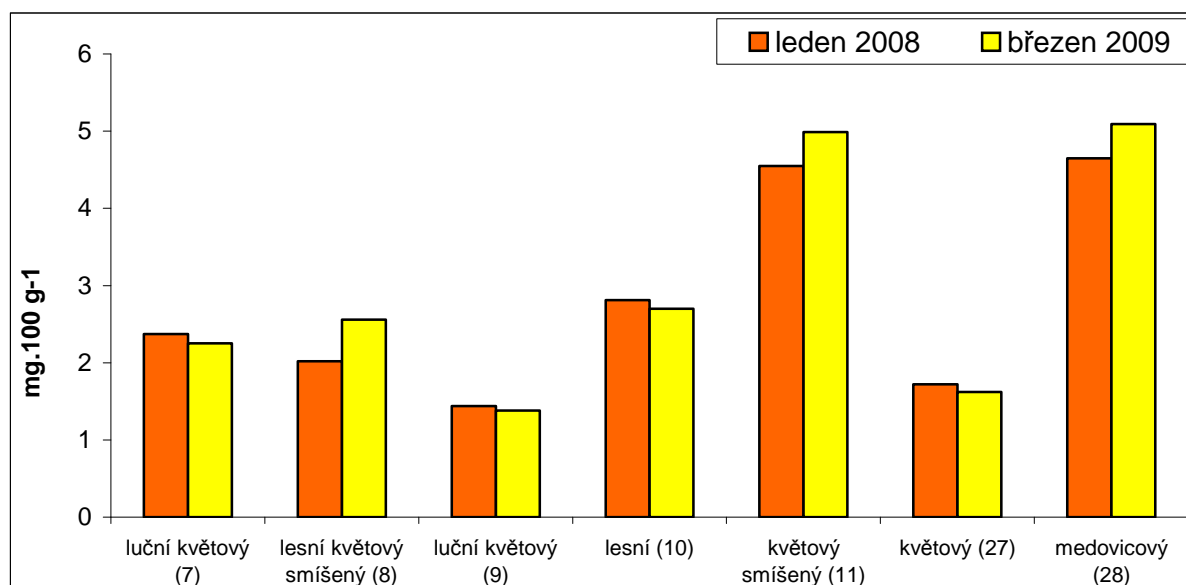
26	ostropestřec mariánský	$4,74 \pm 0,07$	$5,32 \pm 0,18$	-12,26
27	květový	$1,72 \pm 0,09$	$1,62 \pm 0,07$	5,80
28	medovicový	$4,65 \pm 0,07$	$5,09 \pm 0,24$	-9,40
29	propolis	$0,00 \pm 0,00$	$25,20 \pm 0,00$ ¹⁾	-
			$61,28 \pm 4,09$ ²⁾	-
30	směs připravená v laboratoři	$1,33 \pm 0,09$	$2,13 \pm 0,18$	-60,13

Poznámka pro tabulku 23: ¹⁾ navážka propolisu byla rozpuštěna dle návodu (kap. 4.4.4) v 2% kyselině chlorovodíkové a poté titrována.

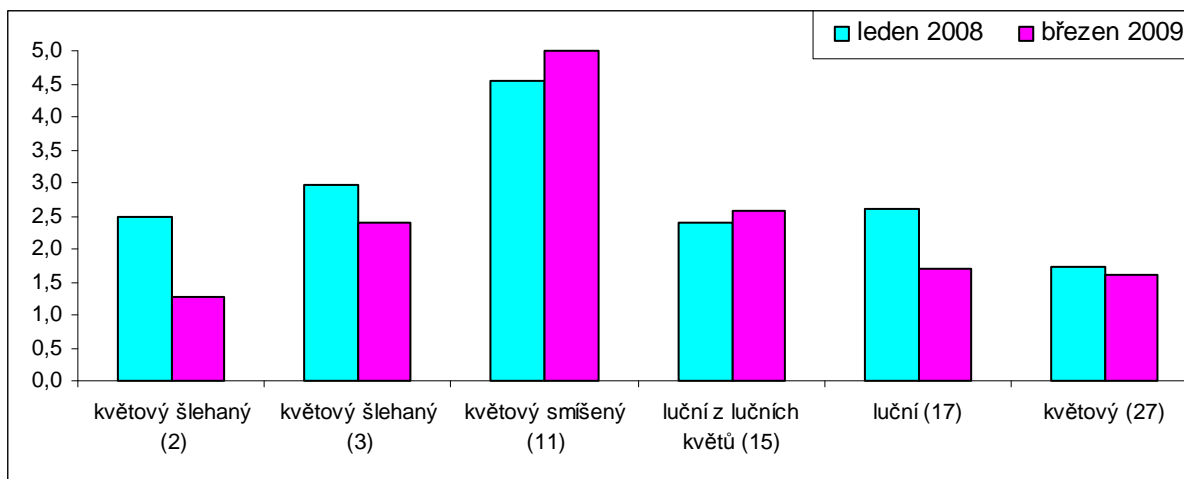
²⁾ navážka propolisu byla rozpuštěna v absolutním ethanolu a poté titrována (kap. 4.4.4).



Graf 24: Obsah kyseliny askorbové u vybraných vzorků medů (skupina 1).



Graf 25: Obsah kyseliny askorbové u vybraných vzorků medů (skupina 2).



Graf 26: Obsah kyseliny askorbové u vybraných vzorků medů (skupina 3).

Obsah kyseliny askorbové byl titračně stanoven v rozmezí (0,50 - 6,86) mg.100 g⁻¹ medu. Nejméně kyseliny askorbové obsahoval med akátový (21) s označením bio zakoupený v roce 2009. Nejvyšší obsah byl u medu pohankového (24). Z intervalu hodnot obsahu kyseliny askorbové byl vynechán med s obsahem mateří kašičky, kde byl obsah kyseliny askorbové 532,73 mg.100 g⁻¹ medu. Takto vysokou hodnotu způsobil přídavek kyseliny askorbové do medu jako konzervantu v množství 0,8 %. Na vysokém obsahu se mohla podílet také samotná mateří kašička. Výraznější úbytky askorbátu byly zaznamenány spíše v medech získaných přímo od včelařů, což by mohlo být do jisté míry způsobeno i tím, že tyto medy mají obsah askorbátu získaný přímo od včel, zatímco průmyslově dodávané medy jsou stabilizovány dodatečným přídavkem askorbátu.

U propolisu byl obsah kyseliny askorbové stanoven dvěma způsoby. V prvním případě byla navážka propolisu rozpuštěna v příslušném objemu 2% HCl a vzorek byl následně titrován podle postupu v kapitole (4.4.4). Při tomto stanovení byl obsah kyseliny askorbové stanoven na hodnotu 25,20 mg.100⁻¹ g medu. V druhém případě byla navážka propolisu rozpuštěna v absolutním ethanolu a poté byla titrována (kap. 4.4.4). V tomto případě byl obsah kyseliny askorbové stanoven na 61,28 mg.100⁻¹ g medu. Obsah kyseliny askorbové u propolisu rozpuštěného v ethanolu byl naměřen téměř dva a půl krát vyšší než u propolisu rozpuštěného v 2% HCl. To může být způsobeno tím, že při rozpuštění v ethanolu přešlo do roztoku více kyseliny askorbové, popřípadě mohla být ethanolem lépe stabilizovaná.

Ze srovnání výsledků hodnot obsahu kyseliny askorbové je patrné, že vyšší nebo dlouhodobě stabilní hodnoty byly nalezeny ve vzorcích s vysokou hladinou TAS. Lze předpokládat, že askorbát je hlavním faktorem přispívajícím k vysoké hladině TAS, avšak nemusí být nutně nejvýznamnější složkou medu přispívající k jeho antimutagennímu účinku. Vysokou antimutagenitu vykazují spíše medy se střední stabilní hodnotou askorbátu - luční a květové směsi, eukalyptový (16), pomerančový (19) a maliníkový med (25); vyšší hodnotu askorbátu a současně vyšší antimutagenitu vykazuje medovicový med (28).

6.3.5 Stanovení obsahu α -, β -karotenu, α -tokoferolu a luteinu

Lipofilní vitaminy a provitaminy jsou v medu obsaženy ve velmi malých množstvích, mohou však jako složka antioxidačního komplexu rovněž přispět k biologickým účinkům medu. Výše uvedené látky byly stanoveny podle postupu viz kapitola (4.4.5).

Všechny vzorky byly proměřeny třikrát. Z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Tab. 24: Stanovení α -, β -karotenu a luteinu

č.	Druh medu	lutein [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu]	α -karoten [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu]	β -karoten [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu]
1	lipový	$0,66 \pm 0,010$	$74,13 \pm 5,64$	$4\,300,23 \pm 25,16$
2	květový (šlehaný)	ND	ND	ND
3	květový (šlehaný)* D	ND	$180,30 \pm 11,33$	$246,99 \pm 4,76$
	květový (šlehaný)* S	$0,41 \pm 0,002$	$437,42 \pm 28,42$	$63,59 \pm 2,81$
	květový (šlehaný)* V	ND	$448,93 \pm 31,58$	$335,04 \pm 2,86$
4	slunečnicový	ND	ND	ND
5	řepkový (natural)	ND	$101,67 \pm 8,97$	$450,78 \pm 3,16$
6	řepkový (pastovaný)	ND	ND	$106,99 \pm 7,76$
7	luční (květový)	ND	ND	ND
8	lesní (květový smíšený)	ND	$494,75 \pm 28,93$	$415,88 \pm 8,63$
9	luční (květový)	$0,22 \pm 0,001$	$219,35 \pm 31,62$	$251,05 \pm 14,67$
10	lesní	$0,06 \pm 0,002$	ND	ND
11	květový smíšený	$0,14 \pm 0,000$	$529,75 \pm 37,13$	$229,44 \pm 8,56$
12	s tymiánem a bylinami	ND	ND	$40,45 \pm 2,61$
13	akátový	$0,26 \pm 0,001$	ND	ND
14	mateří kašička v medu	$0,19 \pm 0,002$	$131,83 \pm 14,08$	ND
15	luční (z lučních květů)	$0,31 \pm 0,002$	ND	ND
16	med z eukalyptových květů	$0,27 \pm 0,002$	$361,24 \pm 10,05$	$272,89 \pm 12,09$
17	luční	$0,22 \pm 0,001$	$1\,671,47 \pm 49,25$	$3\,734,02 \pm 86,45$
18	akátový	$0,37 \pm 0,002$	$990,89 \pm 26,13$	$2\,721,72 \pm 59,63$
19	med z pomerančových květů	ND	$759,90 \pm 4,56$	$1\,360,40 \pm 54,99$
23	„včelí mystérium“	$0,13 \pm 0,001$	ND	$73,20 \pm 3,58$
24	pohankový	$0,27 \pm 0,001$	$791,22 \pm 6,25$	$139,37 \pm 4,68$
25	maliníkový	$0,15 \pm 0,001$	$68,19 \pm 3,73$	$256,20 \pm 9,97$
26	ostropesťec mariánský	ND	$58,76 \pm 2,57$	$106,99 \pm 8,71$
27	květový	ND	ND	ND
28	medovicový	ND	$79,97 \pm 0,63$	$2\,643,79 \pm 79,42$
29	propolis	ND	$1\,144,53 \pm 28,69$	$17\,246,69 \pm 211,18$
30	směs připravená v laboratoři	ND	ND	$264,62 \pm 13,2$

Poznámka pro tabulku 24: Med květový (šlehaný)* je med se zřetelně oddělenou glukózovou a fruktózovou vrstvou. Pro některé analýzy byly použity obě vrstvy zvlášť a ještě tyto vrstvy smíchány v poměru přibližně 1 : 1.

Tedy: - květový (šlehaný)* D - dolní (glukózová) vrstva
- květový (šlehaný)* S - směs obou vrstev
- květový (šlehaný)* V - vrchní (fruktózová) vrstva

ND = non-detected, látka nebyla v medu identifikována

Obsah luteinu se v medech pohyboval v rozmezí (0,06 - 0,66) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně bylo naměřeno v lesním medu (10), nejvíce v medu lipovém (1), který byl pořízen přímo od včelaře. U poloviny z analyzovaných vzorků se pro velmi nízký obsah nepodařilo lutein vůbec identifikovat, což platí také pro vzorek propolisu. Pro α -karoten byl obsah v medech stanoven v rozmezí (58,76 - 1 671,47) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně jej obsahoval med z ostropestřce mariánského (26), nejvíce med luční s označením bio (17). Vzorek propolisu obsahoval 1 144,53 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ propolisu. U některých vzorků medu nebyl α -karoten identifikován. Obsah β -karotenu se v medech pohyboval v rozmezí (40,45 - 4300,23) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně byl obsažen v medu s tymiánem a bylinami (12), nejvíce v medu lipovém (1), který byl zakoupen u včelaře. Propolis obsahoval 17 246,69 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ propolisu.

Celkově je v medech obsah karotenoidů velmi nízký, i když v literatuře bývá přítomnost těchto antioxidačních pigmentů běžně popisována. U šesti vzorků medu nebyl identifikován α - ani β -karoten, u tří byl identifikován pouze α -karoten, u dvou medů byl identifikován pouze β -karoten. Podobně nízké hodnoty byly nalezeny rovněž v předchozí práci, v níž se rovněž nepodařilo identifikovat všechny deriváty ve všech analyzovaných vzorcích medu. S ohledem na nízký obsah nelze očekávat, že karotenoidy budou významně přispívat k biologickým účinkům medu, i když svou roli v antioxidačním komplexu jistě zastupují.

Tab. 25: Rovnice kalibračních závislostí pro výpočet obsahu α -, β -karotenu, luteinu a α -tokoferolu.

Látka	Kalibrační závislost	Regresní koeficient
lutein	$y = 752,28x$	$R^2 = 0,9977$
α -karoten ¹⁾	$y = 0,2319x$	$R^2 = 0,9921$
β -karoten	$y = 0,2319x$	$R^2 = 0,9921$
α -tokoferol	$y = 21,91x$	$R^2 = 0,9978$

Poznámka pro tabulku 25: ¹⁾ - pro výpočet obsahu α -karotenu byla použita kalibrační závislost pro β -karoten.

Tab. 26: Stanovení α -tokoferolu

č.	Druh medu	α -tokoferol [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu] leden 2008 [47]	α -tokoferol [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu] březen 2009
1	lipový	$152,97 \pm 18,52$	$298,63 \pm 30,16$
2	květový (šlehaný)	$151,63 \pm 12,30$	$182,09 \pm 17,83$
3	květový (šlehaný)* D	-	$110,17 \pm 9,56$
	květový (šlehaný)* S	$120,35 \pm 16,21$	$143,79 \pm 7,83$
	květový (šlehaný)* V	-	$153,82 \pm 12,18$
4	slunečnicový	$127,78 \pm 17,88$	$174,71 \pm 17,94$
5	řepkový (natural)	$112,31 \pm 10,24$	$126,38 \pm 8,60$
6	řepkový (pastovaný)	$248,71 \pm 11,26$	$245,44 \pm 17,73$
7	luční (květový)	$140,19 \pm 18,55$	$355,00 \pm 22,62$
8	lesní (květový smíšený)	$300,07 \pm 25,64$	$54,33 \pm 4,81$
9	luční (květový)	$159,81 \pm 19,00$	$98,68 \pm 9,54$
10	lesní	$221,64 \pm 13,95$	$50,63 \pm 3,74$

11	květový smíšený	196,61 ± 17,67	114,57 ± 10,60
12	s tymiánem a bylinami	216,72 ± 11,28	242,74 ± 16,74
13	akátový	122,43 ± 10,61	126,01 ± 8,54
14	mateří kašička v medu	185,82 ± 9,83	81,54 ± 7,64
15	luční (z lučních květů)	296,77 ± 17,11	221,65 ± 18,64
16	med z eukalyptových květů	463,59 ± 26,44	156,00 ± 13,12
17	luční	189,03 ± 21,63	204,87 ± 16,63
18	akátový	170,55 ± 28,34	109,33 ± 8,97
19	med z pomerančových květů	179,90 ± 29,43	151,51 ± 14,95
23	„včelí mystérium“	29,20 ± 0,62	194,58 ± 13,76
24	pohankový	220,75 ± 10,41	199,25 ± 12,85
25	maliníkový	197,67 ± 29,96	197,97 ± 16,43
26	ostropestřec mariánský	99,04 ± 4,48	156,11 ± 13,77
27	květový	49,32 ± 3,91	89,84 ± 6,34
28	medovicový	1674,33 ± 33,75	149,81 ± 9,00
29	propolis	-	162 603,07 ± 3 257,89
30	směs připravená v laboratoři	8531,17 ± 59,55	587,82 ± 42,65

Při analýze α -tokoferolu byl jeho obsah stanoven v rozmezí (50,63 - 355,00) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně α -tokoferolu obsahoval med lesní (10), nejvíce med luční květový (7) zakoupený přímo od včelaře. Vysoký obsah α -tokoferolu měl také med s tymiánem a bylinami (12), lipový a řepkový med (12, 1, 6). Velmi vysoký obsah byl změřen u vzorku propolisu, který obsahoval 162 603,07 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ tokoferolu. Ve srovnání s měřením v loňském roce došlo u řady vzorků k výraznějšímu poklesu tokoferolu, avšak byl identifikován ve všech vzorcích medu. Vzhledem k relativně vysokému obsahu tokoferolu může tento individuální membránový antioxidant přispět k antioxidačním i antimutagenním vlastnostem medů, přímá korelace však prokázána nebyla.

6.3.6 Stanovení obsahu katechinů metodou HPLC

Analýza jednotlivých katechinů byla provedena podle návodu viz kapitola (4.4.6).

Měření každého vzorku bylo provedeno třikrát, z naměřených hodnot byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tab. 27: Kalibrační závislosti pro výpočet obsahu katechinů.

Látka	kalibrační závislost	regresní koeficient
katechin	$y = 29,03x$	$R^2 = 0,9915$
epikatechin	$y = 23,94x$	$R^2 = 0,9986$
katechin gallát	$y = 28,69x$	$R^2 = 0,9955$
epikatechin gallát	$y = 80,43x$	$R^2 = 0,9923$
kyselina ferulová	$y = 264,54x$	$R^2 = 0,9902$
kyselina chlorogenová	$y = 151,94x$	$R^2 = 0,9872$

Tab. 28: Obsah katechinu, epikatechinu a katechin gallátu v analyzovaných medech a v propolisu.

č.	Druh medu	katechin [μg.100 g ⁻¹ medu]	epikatechin [μg.100 g ⁻¹ medu]	katechin gallát [μg.100 g ⁻¹ medu]
1	lipový	34,83 ± 1,34	ND	5,15 ± 0,48
2	květový (šlehaný)	5,95 ± 0,43	22,89 ± 1,18	8,06 ± 0,75
3	květový (šlehaný)	46,09 ± 3,25	ND	ND
4	slunečnicový	36,97 ± 2,18	ND	ND
5	řepkový (natural)	34,21 ± 3,30	ND	ND
6	řepkový (pastovaný)	6,33 ± 0,54	39,74 ± 3,40	11,23 ± 0,85
7	luční (květový)	31,37 ± 1,74	ND	ND
8	lesní (květový smíšený)	ND	48,82 ± 3,7	7,34 ± 0,34
9	luční (květový)	25,47 ± 1,47	ND	3,67 ± 0,01
10	lesní	8,82 ± 0,70	35,41 ± 3,2	3,97 ± 0,02
11	květový smíšený	76,23 ± 5,53	32,76 ± 2,67	37,20 ± 1,25
12	s tymiánem a bylinami	12,82 ± 1,11	49,42 ± 5,01	40,23 ± 1,86
13	akátový	29,12 ± 1,71	5,00 ± 0,48	3,85 ± 0,02
14	mateří kašička v medu	859,58 ± 43,86	1116,68 ± 75,33	ND
15	luční (z lučních květů)	39,67 ± 2,76	11,84 ± 1,01	6,36 ± 0,03
16	med z eukalyptových květů	43,59 ± 4,56	22,87 ± 1,98	19,09 ± 0,80
17	luční	32,00 ± 1,17	64,75 ± 3,48	9,32 ± 0,71
18	akátový	8,93 ± 0,43	17,95 ± 1,65	ND
19	med z pomerančových květů	6,61 ± 0,53	27,20 ± 2,32	41,11 ± 1,78
20	luční*	30,80 ± 3,10	34,09 ± 3,01	5,59 ± 0,43
21	akátový*	13,92 ± 0,09	24,90 ± 1,98	ND
22	med z pomerančových květů*	5,10 ± 0,04	16,08 ± 0,93	18,51 ± 1,18
23	„včelí mystérium“	16,78 ± 0,95	17,68 ± 1,16	62,28 ± 4,43
24	pohankový	ND	28,17 ± 1,76	ND
25	maliníkový	19,17 ± 0,75	22,78 ± 1,54	40,24 ± 3,25
26	ostropestřec mariánský	12,40 ± 1,12	69,90 ± 4,23	52,13 ± 4,42
27	květový	39,97 ± 2,26	11,70 ± 0,63	10,39 ± 0,80
28	medovicový	43,97 ± 1,64	100,03 ± 8,83	16,00 ± 1,30
29	propolis	741,16 ± 21,27	ND	57,72 ± 3,51
30	směs připravená v laboratoři	3,86 ± 0,11	11,23 ± 1,53	108,62 ± 9,73

Tab. 29: Obsah epikatechin gallátu, kyseliny chlorogenové a kyseliny ferulové v analyzovaných vzorcích medu a ve vzorku propolisu.

č.	Druh medu	epikatechin gallát [μg.100 g ⁻¹ medu]	kyselina chlorogenová [μg.100 g ⁻¹ medu]	kyselina ferulová [μg.100 g ⁻¹ medu]
1	lipový	7,12 ± 0,66	1,07 ± 0,04	1,23 ± 0,09
2	květový (šlehaný)	4,24 ± 0,24	10,10 ± 0,98	0,46 ± 0,01
3	květový (šlehaný)	ND	2,35 ± 0,11	1,92 ± 0,96
4	slunečnicový	2,94 ± 0,21	ND	ND
5	řepkový (natural)	ND	0,45 ± 0,00	0,67 ± 0,02
6	řepkový (pastovaný)	3,03 ± 0,23	9,35 ± 0,43	0,59 ± 0,32
7	luční (květový)	ND	18,33 ± 1,36	0,42 ± 0,00
8	lesní (květový smíšený)	ND	1,59 ± 0,06	ND
9	luční (květový)	1,55 ± 0,63	1,55 ± 0,06	ND
10	lesní	3,95 ± 0,22	2,60 ± 0,12	ND
11	květový smíšený	9,19 ± 0,10	16,69 ± 1,12	ND
12	s tymiánem a bylinami	12,93 ± 0,93	38,06 ± 3,15	ND
13	akátový	8,52 ± 0,44	1,25 ± 0,11	0,30 ± 0,01
14	mateří kašička v medu	ND	9,36 ± 0,76	ND
15	luční (z lučních květů)	2,65 ± 0,02	19,87 ± 1,18	0,82 ± 0,04
16	med z eukalyptových květů	6,54 ± 0,54	2,64 ± 0,14	10,76 ± 0,06
17	luční	5,88 ± 0,51	11,53 ± 0,93	1,38 ± 0,06
18	akátový	1,37 ± 0,20	6,15 ± 0,53	ND
19	med z pomerančových květů	4,60 ± 0,37	20,84 ± 1,18	ND
20	luční*	2,72 ± 0,02	5,53 ± 0,48	3,97 ± 0,26
21	akátový*	1,19 ± 0,02	6,73 ± 0,39	0,12 ± 0,01
22	med z pomerančových květů*	1,73 ± 0,10	6,92 ± 0,33	0,29 ± 0,00
23	„včelí mystérium“	5,55 ± 0,43	28,23 ± 0,24	ND
24	pohankový	2,99 ± 0,12	ND	0,92 ± 0,03
25	maliníkový	4,89 ± 0,38	11,97 ± 0,87	2,85 ± 0,01
26	ostropestřec mariánský	7,21 ± 0,08	13,77 ± 1,10	5,80 ± 0,43
27	květový	2,82 ± 0,05	3,36 ± 0,43	0,86 ± 0,04
28	medovicový	2,65 ± 0,13	2,61 ± 0,16	ND
29	propolis	44,47 ± 1,21	36,76 ± 2,27	ND
30	směs připravená v laboratoři	ND	ND	ND

Obsah katechinu se v analyzovaných vzorcích medů a propolisu pohyboval v rozsahu (5,10 - 859,58) μg.100 g⁻¹ medu. Nejméně katechinu obsahoval med z pomerančových květů (19), velmi vysoký obsah převyšující ostatní hodnoty měl med s přidavkem mateří kašičky (14). Epikatechinu bylo ve vzorcích stanoveno množství (5,00 - 1116,68) μg.100 g⁻¹ medu. Nejméně epikatechinu obsahoval akátový med (13), nejvíce med s přidavkem mateří kašičky. Tato hodnota opět velmi výrazně přesahovala ostatní hodnoty. Katechin gallátu bylo

stanoveno (3,67 - 62,28) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně jej bylo zjištěno v lučném květovém medu (9), nejvíce v medu „včelí mystérium“ (23). Obsah epikatechin gallátu byl (1,19 - 12,93) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně epikatechin gallátu obsahoval akátový med (21), nejvíce pak med s tymiánem a bylinami (12). Kyselina chlorogenová byla stanovena ve vzorcích v množství (0,45 - 38,06) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně kyseliny chlorogenové obsahoval řepkový med natural (5), nejvíce med s tymiánem a bylinami (12). Kyselina ferulová byla stanovena v rozsahu (0,12 - 10,76) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně byla obsažena v medu akátovém s označením bio (21), nejvíce v medu z eukalyptových květů (16) rovněž s označením bio.

Vzorek propolisu obsahoval 741,16 μg katechinu.100 g^{-1} propolisu, 57,72 μg katechin gallátu.100 g^{-1} propolisu, epikatechin gallátu 44,47 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, kyseliny chlorogenové 36,76 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Epikatechin a kyselina ferulová nebyly v propolisu detekovány.

Ve srovnání s výsledky z předchozí práce došlo u některých vzorků ke zvýšení obsahu katechinů, u jiných se obsah naopak snížil, nebo dokonce již nebylo možno příslušnou látku identifikovat. Např. v březnu obsahoval med pohankový (24) nejvíce katechinu ze všech vzorků medů, v březnu 2009 již nebyl katechin u tohoto medu identifikován. Tato skutečnost je obecně nejvíce zřetelná u katechin gallátu a také u epikatechinu. Opačná situace nastala u epikatechin gallátu, kdy v březnu 2008 byl identifikován pouze u čtyř vzorků, v březnu 2009 se již podařilo identifikovat jej u většiny vzorků. Kromě vzorků 6, 14, 18 došlo u všech medů ke snížení obsahu epikatechinu. K výraznému úbytku katechinů došlo u jednodruhových medů (př. 24, 25).

Vzhledem k tomu, že metoda HPLC/UV-VIS i přes řadu optimalizací neumožňuje dostatečnou separaci katechinů a řady dalších případných látek přítomných s vysokou pravděpodobností ve vodném extraktu medu, lze očekávat zkreslení kvantitativních hodnot vlivem koeluce dalších látek. Z toho důvodu byly medy analyzovány rovněž s využitím on-line kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí za účelem detailnější identifikace složek eluovaných v podobném či shodném retenčním čase.

Hladiny katechinů a všech ostatních flavonoidů byly analyzovány metodou LC/MS jak ve vodném extraktu, tak i v extraktu do ethylacetátu, a to dle postupu uvedeného v kap. (4.4.10). Vyhodnocení LC/MS bylo provedeno pouze semikvantitativně na základě odezvy přístroje, poněvadž z časových důvodů nebylo možné provést veškeré potřebné kalibrace na kvantitativní hodnocení všech analyzovaných flavonoidů. Pro srovnání výsledků z HPLC/UV-VIS a LC/MS je uvedena následující tabulka. Z tabulky je patrné, že pomocí hmotnostní detekce nelze odlišit polohové izomery katechin/epikatechin a katechingallát/epikatechingallát.

Tab. 30: Semikvantitativní stanovení obsahu katechinů metodou on-line LC/MS.

č.	Druh medu	Katechin epikatechin	Katechin-gallát (epikatechin- gallát)	Kyselina ferulová	Kyselina chlorogenová
1	lipový	+++	++	+	+
2	květový (šlehaný)	+	+	+	+
3	květový (šlehaný)	+/-	+	+/-	+
4	slunečnicový	+/-	+	+/-	+
5	řepkový (natural)	++	++	+	++
6	řepkový (pastovaný)	+	+	+/-	+
7	luční (květový)	+	+	+/-	+
8	lesní (květový smíšený)	+/-	+	+/-	+
9	luční (květový)	+	++	+	+
10	lesní	+	+	+	+
11	květový smíšený	+	+	+/-	+
12	s tymiánem a bylinami	+	+	+/-	+
13	akátový	+	+	+/-	+
14	mateří kašička v medu	+	+	+	+
15	luční (z lučních květů)	+	+	+	+
16	med z eukalyptových květů	+/-	+	+/-	++
17	luční	+	+	+/-	+
18	akátový	+/-	+	+/-	+
19	med z pomerančových květů	+	+	+/-	+
23	„včelí mystérium“	+	+	+/-	+
24	pohankový	+	+	+	+
25	maliníkový	+	+	+/-	+
26	ostropestřec mariánský	++	+++	+	++
27	květový	+	++	+/-	+
28	medovicový	+	ND	+/-	+
29	propolis	+	+	+/-	+
30	směs připravená v laboratoři	+	+	+	+

Pozn. ke kvantifikaci: odezva v řádu 10E5...+++, 10E4...++, 10E3...+, 10E2...+/-

Při srovnání výsledků získaných pomocí HPLC-UV/VIS a LC/MS byly zjištěny některé odlišnosti. Například u medu lipového (1) byl pomocí LC/MS detekován epikatechin v poměrně silné intenzitě 10E5, avšak metodou HPLC-UV/VIS nebyl vůbec detekován. Totéž platí pro epikatechin a katechin/epikatechin gallát u medu řepkového natural (5). Naopak u medovicového medu (28) nebyl pomocí LC/MS detekován katechin gallát, kdežto HPLC-UV/VIS jej zaznamenala. Tyto nepřesnosti budou patrně způsobeny tím, že u HPLC chromatogramů se pravděpodobně berou do úvahy směsné píky jako pík jediné látky nebo dochází k nepřesnostem při selekci jediného píku ze skupiny píků nedostatečně rozdělených. Identifikace je provedena s využitím externích standardů, jejichž retenční časy jsou velmi blízké a píky mohou být směsné, čímž je zkreslena kvantifikace. U identifikace sloučenin

hmotnostní detekcí může zase docházet k záměně hledané sloučeniny za jiný derivát popř. jinou látku se stejným m/z.

Celkově lze konstatovat, že podle výsledků LC/MS se katechiny a katechingalláty vyskytují v převážné většině medů, takže nemohou sloužit jako kritérium pro upřesnění autenticity či původu medu.

6.3.7 Stanovení obsahu jednotlivých flavonoidů pomocí metody HPLC

Stanovení obsahu jednotlivých flavonoidů bylo provedeno podle návodu viz kapitola (4.4.7). Všechna měření byla provedena třikrát. Z naměřených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Tab. 31: Kalibrační závislosti pro výpočet obsahu jednotlivých flavonoidů.

Látka	Kalibrační závislost	Regresní koeficient
rutin	$y = 124,80x$	$R^2 = 0,9993$
myricetin	$y = 427,64x$	$R^2 = 0,9994$
morin	$y = 150,65x$	$R^2 = 0,9985$
luteolin	$y = 267,33x$	$R^2 = 0,9978$
kvercetin	$y = 358,10x$	$R^2 = 0,9986$
naringenin	$y = 4,25x$	$R^2 = 0,9971$
apigenin	$y = 176,83x$	$R^2 = 0,9992$
kaempferol	$y = 383,55x$	$R^2 = 0,9991$

Tab. 32: Stanovení obsahu rutinu, myricetinu a morinu.

č.	Druh medu	rutin [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu]	myricetin [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu]	morin [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu]
1	lipový	$160,80 \pm 13,25$	$14,81 \pm 1,22$	$49,16 \pm 3,01$
2	květový (šlehaný)	$145,01 \pm 11,08$	$24,26 \pm 1,64$	$146,78 \pm 8,63$
3	květový (šlehaný)	$168,71 \pm 8,63$	$12,71 \pm 0,63$	$71,00 \pm 3,61$
4	slunečnicový	$283,61 \pm 20,25$	$34,27 \pm 2,21$	$63,64 \pm 5,55$
5	řepkový (natural)	$145,67 \pm 7,63$	$22,84 \pm 0,54$	$45,90 \pm 1,28$
6	řepkový (pastovaný)	$202,31 \pm 6,85$	$21,59 \pm 0,84$	$55,49 \pm 4,46$
7	luční (květový)	$191,90 \pm 6,34$	$22,73 \pm 2,10$	$9,58 \pm 0,45$
8	lesní (květový smíšený)	$122,88 \pm 8,11$	$36,47 \pm 2,27$	$130,16 \pm 4,26$
9	luční (květový)	$142,79 \pm 5,53$	$12,73 \pm 0,95$	$232,57 \pm 9,74$
10	lesní	$434,42 \pm 17,83$	$38,13 \pm 2,87$	$83,93 \pm 2,73$
11	květový smíšený	$726,09 \pm 32,15$	$54,38 \pm 5,01$	$121,07 \pm 4,35$
12	s tymiánem a bylinami	$734,67 \pm 38,89$	$218,33 \pm 7,14$	$105,05 \pm 2,87$
13	akátový	$130,22 \pm 4,21$	$9,44 \pm 0,52$	$24,46 \pm 1,43$
14	mateří kašička v medu	$879,93 \pm 22,16$	$46,75 \pm 1,18$	$64,75 \pm 5,58$
15	luční (z lučních květů)	$327,54 \pm 15,72$	$37,96 \pm 3,20$	$120,96 \pm 7,85$
16	med z eukalyptových květů	$730,60 \pm 23,45$	$184,22 \pm 11,42$	$38,79 \pm 2,63$
17	luční	$737,60 \pm 43,18$	$180,71 \pm 7,43$	$141,90 \pm 12,53$

18	akátový	178,65 ± 11,32	7,11 ± 0,65	ND
19	med z pomerančových květů	730,39 ± 12,76	29,61 ± 1,84	107,87 ± 4,62
20	luční*	803,39 ± 23,25	86,95 ± 3,84	187,17 ± 8,57
21	akátový*	88,83 ± 2,47	4,21 ± 0,32	66,73 ± 4,27
22	med z pomerančových květů*	329,53 ± 12,32	21,20 ± 1,67	91,85 ± 6,52
23	„včelí mystérium“	486,32 ± 21	180,71 ± 4,66	147,24 ± 12,15
24	pohankový	547,61 ± 18	7,11 ± 0,21	227,77 ± 14,62
25	maliníkový	302,61 ± 15,42	29,61 ± 2,48	178,69 ± 12,41
26	ostropestřec mariánský	398,73 ± 8,93	28,55 ± 2,84	74,90 ± 6,73
27	květový	402,50 ± 21,74	32,70 ± 2,06	85,63 ± 8,48
28	medovicový	368,21 ± 7,28	59,96 ± 3,49	120,87 ± 9,63
29	propolis	23 650,62 ± 5276,85 ¹⁾	4 989,16 ± 55,64 ¹⁾	3 621,36 ± 53,82 ¹⁾
		10 190,80 ± 95,15 ²⁾	3 534,82 ± 38,21 ²⁾	4 513,51 ± 98,73 ²⁾
30	směs připravená v laboratoři	319,29 ± 12,15	35,07 ± 3,12	46,04 ± 4,21

Poznámka pro tabulku 32, 33, 34: ND = látka nebyla v medu identifikována

¹⁾ navážka propolisu byla rozpuštěna v 10 ml absolutního ethanolu a poté byla smíchána s ethylacetátem a odpařena

²⁾ navážka propolisu byla přímo rozpuštěna v ethylacetátu a odpařena

Tab. 33: Stanovení obsahu luteolinu, kvercetin a naringenin.

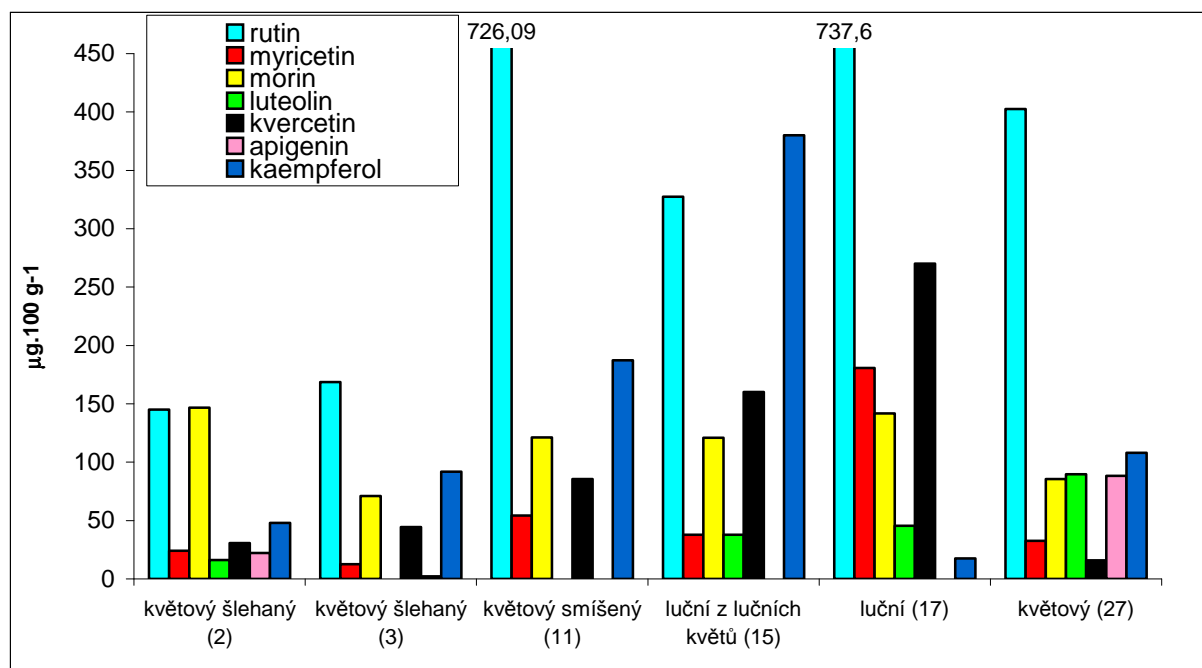
č.	Druh medu	luteolin [μg.100 g ⁻¹ medu]	kvercetin [μg.100 g ⁻¹ medu]	naringenin [μg.100 g ⁻¹ medu]
1	lipový	14,26 ± 0,13	10,66 ± 0,94	295,37 ± 17,16
2	květový (šlehaný)	16,26 ± 0,12	30,59 ± 2,21	1 521,22 ± 22,84
3	květový (šlehaný)	ND	44,55 ± 3,18	1 131,31 ± 26,18
4	slunečnicový	24,10 ± 0,18	66,19 ± 2,25	916,34 ± 84,25
5	řepkový (natural)	20,04 ± 0,09	18,58 ± 1,12	824,47 ± 24,58
6	řepkový (pastovaný)	21,72 ±	25,92 ± 2,14	1 051,09 ± 60,00
7	luční (květový)	13,12 ±	32,01 ± 1,64	626,36 ± 13,06
8	lesní (květový smíšený)	17,47 ±	15,45 ± 1,23	185,17 ± 11,07
9	luční (květový)	14,39 ±	49,94 ± 5,16	715,54 ± 42,96
10	lesní	21,61 ±	12,08 ± 0,85	ND
11	květový smíšený	ND	85,99 ± 7,46	2 606,41 ± 78,94
12	s tymiánem a bylinami	42,41 ± 1,43	35,63 ± 2,75	895,76 ± 21,47
13	akátový	8,49 ± 0,56	18,77 ± 2,13	54,85 ± 2,26
14	mateří kašička v medu	20,08 ± 1,34	130,15 ± 8,64	2 157,85 ± 69,37
15	luční (z lučních květů)	37,88 ± 0,22	160,16 ± 13,00	2 837,14 ± 75,52
16	med z eukalyptových květů	74,07 ± 5,60	421,79 ± 33,64	929,25 ± 36,62
17	luční	45,49 ± 3,21	270,17 ± 28,56	4 545,21 ± 121,63
18	akátový	15,37 ± 1,24	23,75 ± 1,17	1 780,98 ± 63,62

19	med z pomerančových květů	16,67 ± 0,65	36,03 ± 1,96	1 219,82 ± 47,72
20	luční*	35,53 ± 1,43	305,26 ± 17,26	2 856,47 ± 132,73
21	akátový*	17,63 ± 0,52	15,79 ± 1,13	985,56 ± 42,16
22	med z pomerančových květů*	22,38 ± 1,48	50,34 ± 4,23	407,11 ± 14,27
23	„včelí mystérium“	29,62 ± 2,01	197,71 ± 16,15	7 084,87 ± 312,73
24	pohankový	39,25 ± 2,04	148,34 ± 8,53	2 631,62 ± 87,66
25	maliníkový	40,94 ± 3,31	100,30 ± 6,73	2 177,10 ± 74,43
26	ostropestřec mariánský	33,94 ± 1,15	156,12 ± 7,25	2 870,34 ± 45,38
27	květový	89,76 ± 6,08	15,96 ± 0,85	3 823,00 ± 86,63
28	medovicový	18,13 ± 1,13	23,11 ± 1,16	ND
29	propolis	1 047,92 ± 26,18 ¹⁾	2 971,20 ± 64,58 ¹⁾	ND
		682,09 ± 14,51 ²⁾	3 016,16 ± 98,53 ²⁾	200 608,50 ± 3164,47 ²⁾
30	směs připravená v laboratoři	13,65 ± 0,98	68,83 ± 3,48	1 174,82 ± 36,38

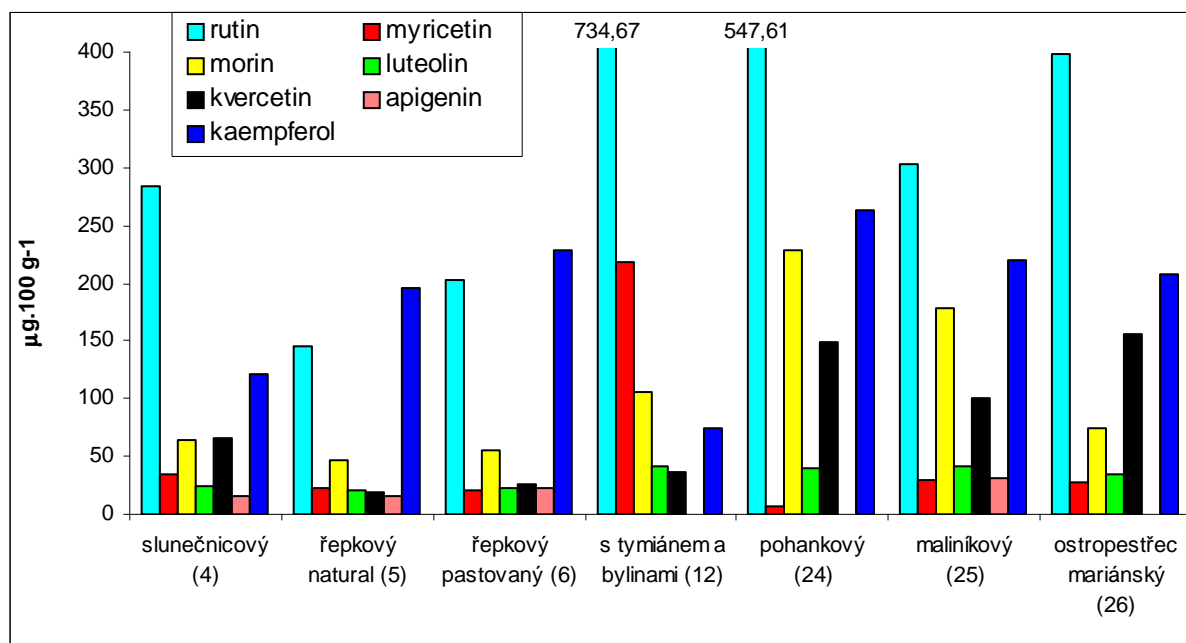
Tab. 34: Stanovení obsahu apigeninu a kaempferolu.

č.	Druh medu	apigenin [μg.100 g ⁻¹ medu]	kaempferol [μg.100 g ⁻¹ medu]
1	lipový	6,08 ± 0,04	113,17 ± 7,47
2	květový (šlehaný)	22,16 ± 1,14	48,12 ± 2,74
3	květový (šlehaný)	2,25 ± 1,52	91,95 ± 6,84
4	slunečnicový	15,16 ± 0,94	120,76 ± 8,37
5	řepkový (natural)	15,10 ± 0,98	194,97 ± 13,63
6	řepkový (pastovaný)	23,37 ± 1,35	228,92 ± 17,73
7	luční (květový)	1,94 ± 0,25	3,51 ± 0,35
8	lesní (květový smíšený)	11,77 ± 1,21	90,12 ± 6,93
9	luční (květový)	ND	109,34 ± 7,28
10	lesní	ND	47,30 ± 0,48
11	květový smíšený	ND	187,16 ± 14,63
12	s tymiánem a bylinami	ND	73,66 ± 3,72
13	akátový	0,78 ± 0,01	33,91 ± 2,73
14	materička kašička v medu	ND	318,97 ± 25,77
15	luční (z lučních květů)	ND	380,12 ± 56,26
16	med z eukalyptových květů	26,39 ± 2,18	49,06 ± 5,38
17	luční	ND	17,54 ± 1,43
18	akátový	ND	36,36 ± 3,28
19	med z pomerančových květů	ND	45,51 ± 2,52
20	luční*	ND	13,10 ± 0,94
21	akátový*	ND	43,53 ± 2,73
22	med z pomerančových květů*	ND	8,75 ± 0,93
23	„včelí mystérium“	59,54 ± 3,71	298,76 ± 63,37
24	pohankový	ND	263,31 ± 47,38

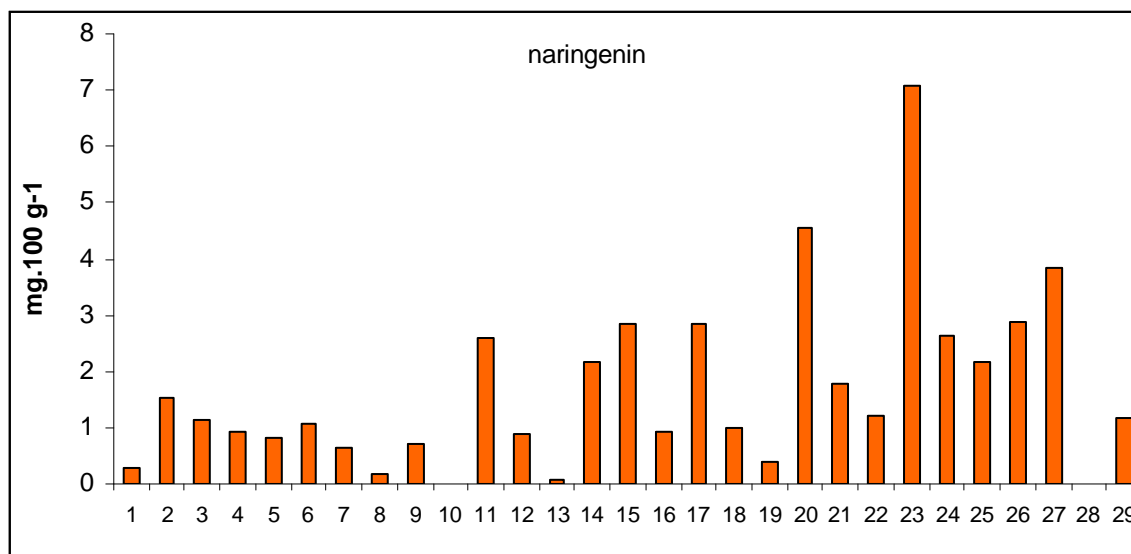
25	maliníkový	$31,71 \pm 1,76$	$220,13 \pm 53,83$
26	ostropestřec mariánský	ND	$207,57 \pm 62,57$
27	květový	$88,42 \pm 4,46$	$107,98 \pm 12,74$
28	medovicový	ND	$53,62 \pm 3,85$
29	propolis	$3\,268,68 \pm 73,26^{1)}$	$2\,506,36 \pm 86,58^{1)}$
		$252,15 \pm 13,12^{2)}$	$1\,211,69 \pm 74,58^{2)}$
30	směs připravená v laboratoři	ND	$92,61 \pm 7,38$



Graf 27: Obsah individuálních flavonoidů analyzovaných pomocí HPLC-UV/VIS ve vybraných vzorcích medů (skupina 3).



Graf 28: Obsah individuálních flavonoidů analyzovaných pomocí HPLC-UV/VIS ve vybraných vzorcích medů (skupina 4).



Graf 29: Obsah naringeninu ve všech analyzovaných medech.

Metodou HPLC/UV-VIS byl ve všech medech identifikován a kvantifikován rutin, myricetin, morin, kvercetin a kaempferol, ve většině medů byl nalezen i naringenin (kromě vzorků 10, 28 a 29) a luteolin (kromě 3 a 11).

Obsah rutinu se ve vzorcích medu pohyboval v rozmezí (88,93 - 879,93) $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu. Nejnižší obsah rutinu vykazoval akátový med bio zakoupený v roce 2009 (21), nejvyšší obsah měl med s přídavkem mateří kašičky. Vysoký obsah vykazoval také med luční s označením bio (20), který měl zároveň nejvyšší hladinu rutinu z analyzovaných biomedů, 803,39 $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu.

Obsah myricetinu se pohyboval v rozmezí (4,21 - 218,33) $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu. Nejméně bylo myricetinu zjištěno u medu akátového s označením bio a zakoupeného v roce 2009, nejvíce u medu s tymiánem a bylinami (12).

Naměřené hodnoty obsahu morinu byly (9,58 - 232,57) $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu. Nejnižší hladina byla zjištěna u medu lučního květového (7). Nejvyšší množství bylo zjištěno u medu lučního květového (9).

Hladina luteolinu se v měřených vzorcích pohybovala v rozmezí (8,49 - 89,76) $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu. Nejméně bylo luteolinu zjištěno u medu akátového (13), nejvíce u medu květového (27). Obsah kvercetinu u analyzovaných vzorků byl v rozsahu (10,66 - 421,79) $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u medu lipového (1), velmi vysoký obsah v porovnání s ostatními medy měl med z eukalyptových květů, který je označen jako biomed (16).

Obsah naringeninu byl v porovnání s obsahem ostatních flavonoidů velmi vysoký, pohyboval se v rozmezí (54,85 - 7 084,87) $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu. Nejméně naringeninu měl med akátový (13), tato hodnota je výrazně nejnižší, med s druhým nejnižším obsahem tohoto flavonoidu, med lesní květový smíšený (8) již obsahoval 185,17 $\mu\text{g.100 g}^{-1}$ medu. Nejvyšší obsah naringeninu měl med „včelí mystérium“ (23).

Rozmezí obsahu apigeninu bylo (1,94 - 59,54) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně jej obsahoval med luční (květový) (7), nejvíce pohankový med (24). U poloviny medů nebyl apigenin identifikován.

Kaempferol byl u analyzovaných medů zjištěn v rozmezí (3,51 - 380,12) $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ medu. Nejméně obsahoval med luční květový (7), nejvíce luční z lučních květů, který nese označení bio.

U analýzy obsahu individuálních flavonoidů u vzorku propolisu se obsah jednotlivých látek značně liší v závislosti na způsobu přípravy. Obsah individuálních flavonoidů byl téměř vždy větší, byl-li propolis nejprve rozpuštěn v absolutním ethanolu a následně v ethylacetátu a pak odpařen (postup viz kapitola 4.4.7). Pouze pro látky kvercetin a morin (které jsou navíc prostorovými izomery) byl jejich obsah vyšší, pokud byl propolis rozpuštěn v ethylacetátu a následně odpařen (4.4.7).

Ze srovnání hodnot individuálních flavonoidů analyzovaných před cca 12 měsíci [47] je patrné, že převážná většina hodnot si odpovídá v řádu. Ve většině vzorků došlo během uchovávání k mírnému či většímu poklesu hladiny jednotlivých flavonoidů. Významný pokles celé skupiny flavonoidů byl zaznamenán u vzorků medu 9 a 11 (luční- supermarket). Apigenin byl podobně jako loni identifikován pouze v některých medech a i zde došlo k poklesu hodnot. U rutinu došlo ve většině případů k mírnému nárůstu hodnot (př. 11, 16, 24), k nejvýraznějšímu poklesu došlo např. u medů 1, 2, 8, 27. U myricetinu byl zaznamenán spíše úbytek, nejvýraznější u medu lučního (15), z eukalyptových květů (16) a květového (27). Významný nárůst byl u medu s tymiánem a bylinami (12). U pohankového medu nebyl v březnu 2008 vůbec myricetin identifikován, v březnu 2009 byla naměřena hodnota 7,11 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Luteolin nebyl identifikován u všech vzorků, byl zaznamenán úbytek, ale také přírůstek a u některých medů byly zaznamenány dokonce velmi podobné hodnoty (př. 2, 18). Významný nárůst obsahu luteolinu byl u medu s tymiánem a bylinami (12), vysoký úbytek pak např. u mateří kašičky v medu (14), medu lučního z lučních květů (15). Také u kvercetinu došlo úbytku (př. 13, 17, 18) a nárůstu (př. 2, 3, 4) jeho obsahu. U medů 1, 10 a 28 byly hladiny kvercetinu velmi podobné. Nárůst obsahu kvercetinu může být způsoben jeho uvolňováním z glykosidů. U naringeninu byly hodnoty výrazně vyšší např. u vzorku 3, 16, 26, výrazný pokles byl zjištěn u vz. 8, 13, 27. Velmi podobné hodnoty se vyskytly u vz. 14 a 24.

Celkově lze shrnout, že během dlouhodobého uchovávání dochází sice ke změnám jednotlivých zástupců flavonoidů, ale celý komplex se mění jen málo a většina zástupců zůstává v medu dlouhodobě přítomna.

6.3.8 Identifikace flavonoidů metodou on-line LC/MS

Metoda HPLC s on-line hmotnostní detekcí umožňuje s využitím přístroje LCQ Advantage Finnigan detailní analýzu flavonoidů v podmínkách gradientové eluce (kap. 4.4.10) spojenou s detekcí a případnou identifikací jednotlivých zástupců pomocí hmotnostní detekce. S ohledem na míru komplexnosti vzorků a na podobnost jednotlivých sloučenin je však získané výsledky třeba hodnotit s určitou rezervou. Je totiž řada derivátů se stejnou molekulovou hmotností, které se podstatně liší v retenčním čase a naopak, ve stejném či velmi blízkém retenčním čase mohou být eluovány podstatně odlišné látky. Identifikace typických zástupců může napomoci identifikaci medů dle původu.

Nejprve byly analyzovány dostupné standardy, aby bylo možné posoudit jejich retenční čas a lépe interpretovat spektra. Poté byly analyzovány všechny reálné vzorky za stejných podmínek jako standardy. Ze získaných hmotnostních spekter byly vyhodnoceny známé látky podle kombinace m/z a očekávaného retenčního času a rovněž předpokládané deriváty podle hodnoty m/z .

Tab. 35: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS – identifikace a zastoupení v jednotlivých medech podle kombinace retenčního času a hodnoty m/z.

č.	Druh medu	kyselina gallová Mr 170; 8,4 min	kyselina ferulová Mr 194; 11,78 min	apigenin Mr 270; 25-26 min	naringenin pinobanksin Mr 272; 24,09 min	morin Mr 302; 6,02 min
1	lipový	+	+	+/-	+	++
2	květový (šlehaný)	+	-	--	--	+
3	květový (šlehaný)	+/-	-	+	+	-
4	slunečnicový	+	+	+	+	-
5	řepkový (natural)	++	-	--	+/-	-
6	řepkový (pastovaný)	+/-	-	+	+	-
7	luční (květový)	+/-	-	+	+	++
8	lesní (květový smíšený)	+	+	+	+/-	+
9	luční (květový)	+	+	+/-	+	+
10	lesní	+/-	+/-	+/-	+	++
11	květový smíšený	+/-	+	+/-	+	++
12	s tymiánem a bylinami	+/-	-	+	+	+
13	akátový	+	+/-	+	+	+
14	mateří kašička v medu	++	+	+	+/-	+
15	luční (z lučních květů)	+/-	-	+/-	+	+/-
16	med z eukalyptových květů	+/-	+	+	+	++
17	luční	--	++	+	+	+
18	akátový	--	--	+	+	+
19	med z pomerančových květů	+	--	--	+	+
23	„včelí mystérium“	+/-	--	+	--	++
24	pohankový	+/-	--	+/-	+	++
25	maliníkový	+	+	+	+/-	+
26	ostropestřec mariánský	+	+	--	+	++
27	květový	+	+	+	+	++
28	medovicový	-	-	+	+	+
29	propolis	+	--	+	--	+
30	směs připravená v laboratoři	+/-	++	+	+	+

+++...obsah v řádu 10.E6; ++...obsah v řádu 10.E5; + ...10.E4; +/- méně než 10.E4

Tab. 36: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS.

č.	Druh medu	myricetin Mr 318; 15,1 min	luteolin Mr 286; 20,2 min	katechin/ epikatechin Mr 290; 7,1 min	kyselina chlorogenová Mr 354; 7,9 min
1	lipový	++	+/-	+	-
2	květový (šlehaný)	-	+	+	+++
3	květový (šlehaný)	+	+/-	+	++
4	slunečnicový	+	+	+	+
5	řepkový (natural)	+/-	-	++	+++
6	řepkový (pastovaný)	+	-	++	++
7	luční (květový)	+	+/-	+/-	++
8	lesní (květový smíšený)	+	+/-	+/-	++
9	luční (květový)	+/-	-	+/-	++
10	lesní	+	+/-	++	++
11	květový smíšený	+	-	+/-	+++
12	s tymiánem a bylinami	+/-	-	+/-	+++
13	akátový	-	+	+	++
14	mateří kašička v medu		+	+	++
15	luční (z lučních květů)	+	-	+/-	+++
16	med z eukalyptových květů	+	-	++	++
17	luční	+	-	++	++
18	akátový	+	+/-	++	+/-
19	med z pomerančových květů	+	+	+	++
23	„včelí mystérium“	+	+/-	-	++
24	pohankový	+	-	+	+++
25	maliníkový	+	-	+	++
26	ostropestřec mariánský	+	-	++	++
27	květový	-	+	+/-	+
28	medovicový	+	-	++	++
29	propolis	++	-	+	++
30	směs připravená v laboratoři	+	+	+	++

+++...obsah v řádu 10.E6; ++...obsah v řádu 10.E5; + ...10.E4; +/- méně než 10.E4

Tab. 37: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS.

č.	Druh medu	kvercetin Mr 302; 22 min	katechin /epi/gallát Mr 442; 8,3 min	rutin Mr 610; 6,02 min	kaempferol Mr 286; 20,2 min
1	lipový	++	+++	+++	+
2	květový (šlehaný)	+/-	+++	+	+
3	květový (šlehaný)	+	+	-	+
4	slunečnicový	-	+/-	-	+
5	řepkový (natural)	+/-	++	+	+
6	řepkový (pastovaný)	-	++	+	+/-
7	luční (květový)	++	++	++	+/-
8	lesní (květový smíšený)	+/-	++	++	+/-
9	luční (květový)	-	++	+/-	-
10	lesní	+	++	+	+/-
11	květový smíšený	+/-	+	+	+
12	s tymiánem a bylinami	+/-	++	+	+
13	akátový	+	++	++	-
14	mateří kašička v medu	+	++	+	+
15	luční (z lučních květů)	-	+	+	+
16	med z eukalyptových květů	+	+/-	+	+
17	luční	+	-	+	+
18	akátový	-	++	+	+
19	med z pomerančových květů	+	++	+	
23	„včelí mystérium“	+	++	++	+
24	pohankový	+	++	++	-
25	maliníkový	+	+	+	+
26	ostropestřec mariánský	+	++	++	+
27	květový	-	+	+	+
28	medovicový	+	+	+	+
29	propolis	+	+	+	+
30	směs připravená v laboratoři	+	++	++	++

+++...obsah v řádu 10.E6; ++...obsah v řádu 10.E5; + ...10.E4; +/- méně než 10.E4

Ve většině medů byl nalezen naringenin, vysoký obsah kyseliny chlorogenové, katechin-
a epikatechin - gallátů, menší obsah rutinu, katechinu a epikatechinu, morinu, kaempferolu,

kvercetin a apigenin, lze detekovat rovněž hesperetin a eriodictyol. Specifický výskyt vykazuje kyselina ferulová - zejména v medech lučních s vysokým výskytem trav či obilovin a kulturních plodin - slunečnicový med, květový luční med. Z fenolových kyselin je ve většině medů přítomna kyselina salicylová a protokatechinová; specifické deriváty typu xanthohumolů C, E, desmethoxyxanthohumolu a prenylxanthohumolu jsou obsaženy zejména v lučních a květových medech. Tyto medy specificky obsahují též chrysin a techtochrysin. Naopak med medovicový neobsahuje kromě chrysinu a techtochrysinu ještě kyselinu ferulovou, naringenin (odlišuje se tím od většiny ostatních medů), kyselinu gallovou a luteolin. Na základě screeningových dat bude vhodné v další práci ohledně autenticity medů zaměřit se na cílené sledování právě derivátů uvedených u medovicového medu.

Tab. 38: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS. - skupina flavonoidů identifikovaných pouze na základě znalosti m/z (nejsou dostupné standardy)

č.	Druh medu	kyselina salicylová Mr 138	kyselina protokatechinová Mr 154	kyselina kumarová Mr 164	kyselina kávová Mr 180
1	lipový	-	+	+/-	+/-
2	květový (šlehaný)	+/-	+	-	+/-
3	květový (šlehaný)	+	-	+	+
4	slunečnicový	+	+	+/-	+/-
5	řepkový (natural)	-	-	-	-
6	řepkový (pastovaný)	+	+	+	+/-
7	luční (květový)	+/-	+	+/-	+/-
8	lesní (květový smíšený)	+	+	+/-	-
9	luční (květový)	+/-	+/-	+/-	+/-
10	lesní	+	+	+/-	+/-
11	květový smíšený	+/-	+/-	+/-	-
12	s tymiánem a bylinami	+	+/-	+/-	+/-
13	akátový	+/-	+	+	+/-
14	mateří kašička v medu	+	+/-	+	+/-
15	luční (z lučních květů)	+	+	+/-	+
16	med z eukalyptových květů	+/-	-	-	+
17	luční	+	+	+	+/-
18	akátový	+/-	+	+	+/-
19	med z pomerančových květů	+	+	+	+/-
23	„včelí mystérium“	+	+	+/-	+/-
24	pohankový	+	+/-	+/-	+/-
25	maliníkový	+	+	+/-	+/-
26	ostropestřec mariánský	+/-	+	+/-	+/-
27	květový	+/-	+/-	+	+/-
28	medovicový	+	+	-	+/-
29	propolis	+	+	+	-

30	směs připravená v laboratoři	+	+/-	+/-	+/-
-----------	---------------------------------	---	-----	-----	-----

Pouze identifikace; +...jednoznačně přítomen; -...jednoznačně nepřítomen; +/-...přítomnost nelze vyloučit

Tab. 39: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS. – skupina flavonoidů identifikovaných pouze na základě znalosti m/z (nejsou dostupné standardy)

č.	Druh medu	desmethylxanthohumol Mr 340	xanthohumol C Mr 352	methylxanthohumol	xanthohumol B, D, E
1	lipový	+	-	+	+
2	květový (šlehaný)	+/-	+	-	-
3	květový (šlehaný)	-	-	-	-
4	slunečnicový	+	+	+/-	-
5	řepkový (natural)	-	-	+	-
6	řepkový (pastovaný)	-	+	+	-
7	luční (květový)	+/-	+/-	-	+/-
8	lesní (květový smíšený)	+/-	-	+	+
9	luční (květový)	+/-	+/-	+/-	+/-
10	lesní	-	-	+/-	-
11	květový smíšený	-	+	+	+
12	s tymiánem a bylinami	+	+	-	+
13	akátový	+/-	+	+	+
14	mateří kašička v medu	+	+	+	+
15	luční (z lučních květů)	-	+/-	-	+
16	med z eukalyptových květů	+		+	+/-
17	luční	+/-	+	+/-	+
18	akátový	+	+/-	+	+
19	med z pomerančových květů	-	+	+/-	+
23	„včelí mystérium“	-	+	-	+
24	pohankový	+/-	+/-	+	+/-
25	maliníkový	+	+/-	+	+
26	ostropestřec mariánský	+/-	+/-	+	+/-
27	květový	+/-	+/-	+/-	+/-
28	medovicový	+/-	-	-	+/-
29	propolis		-	+	+
30	směs připravená v laboratoři	+/-	+	+	+

Pouze identifikace; +...jednoznačně přítomen; -...jednoznačně nepřítomen; +/-...přítomnost nelze vyloučit

Tab. 40: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS. – skupina flavonoidů identifikovaných pouze na základě znalosti m/z (nejsou dostupné standardy)

č.	Druh medu	chalkonaringenin	prenylxanthohumol	chrysin	pinocembrin
1	lipový	+	+	+/-	+/-
2	květový (šlehaný)	+	+	+/-	+
3	květový (šlehaný)	+	+/-	+	+/-
4	slunečnicový	+	+	+	+/-
5	řepkový (natural)	-	+	-	+
6	řepkový (pastovaný)	+	-	+	+
7	luční (květový)	-	+/-	+	+
8	lesní (květový smíšený)	+	+	-	+
9	luční (květový)	-	+/-	+	+
10	lesní	+	+/-	+	+
11	květový smíšený	+	+	+/-	+/-
12	s tymiánem a bylinami	+	+	+/-	+
13	akátový	+	+	+	+
14	mateří kašička v medu	+	+	+/-	+/-
15	luční (z lučních květů)	-	+/-	-	+
16	med z eukalyptových květů	-	+	-	+
17	luční	+	+	+	+
18	akátový	+	+/-	+/-	+/-
19	med z pomerančových květů	+	+/-	+/-	+
23	„včelí mystérium“	+	+/-	-	+/-
24	pohankový	+/-	+/-	-	+/-
25	maliníkový	+/-	+	+	+/-
26	ostropestřec mariánský	+/-	+/-	+/-	+/-
27	květový	+/-	+/-	+	+
28	medovicový	-	+/-	+/-	-
29	propolis	+	-	+	+
30	směs připravená v laboratoři	-	+	+	+/-

Pouze identifikace; +...jednoznačně přítomen; -...jednoznačně nepřítomen; +/-...přítomnost nelze vyloučit

Tab. 41: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS. – skupina flavonoidů identifikovaných pouze na základě znalosti m/z (nejsou dostupné standardy)

č.	Druh medu	techtochrysin	genkwanin	myricetin	8-methoxykaempferol
1	lipový	-	+	+	+/-
2	květový (šlehaný)	+	-	+	+
3	květový (šlehaný)	-	+/-	+	+/-
4	slunečnicový	+	-	+/-	-
5	řepkový (natural)	-	-	+/-	+
6	řepkový (pastovaný)	+	-	-	-
7	luční (květový)	+	-	+/-	-
8	lesní (květový smíšený)	+/-	+	+/-	-
9	luční (květový)	-	+/-	+/-	+
10	lesní	+/-	+	+/-	+/-
11	květový smíšený	+/-	+/-	+/-	+/-
12	s tymiánem a bylinami	+	-	+/-	+/-
13	akátový	+	+	+/-	+/-
14	mateří kašička v medu	+/-	+	+/-	-
15	luční (z lučních květů)	+	-	+/-	+
16	med z eukalyptových květů	+	+	+/-	-
17	luční	+	+	+/-	-
18	akátový	+	+/-	+	+/-
19	med z pomerančových květů	+	-	+/-	+/-
23	„včelí mystérium“	+	-	+/-	-
24	pohankový	+/-	-	+/-	-
25	maliníkový	+	+	+/-	+/-
26	ostropestřec mariánský	-	+/-	+/-	+/-
27	květový	+/-	-	-	-
28	medovicový	+/-	-	-	-
29	propolis	+	+	+	+
30	směs připravená v laboratoři	+	-	+/-	-

Pouze identifikace; +...jednoznačně přítomen; -...jednoznačně nepřítomen; +/-...přítomnost nelze vyloučit

Tab. 42: Detekce flavonoidů metodou on-line LC/MS. – skupina flavonoidů identifikovaných pouze na základě znalosti m/z. (nejsou dostupné standardy)

č.	Druh medu	kaempferol Mr 286	hesperetin Mr 302	isorhamnetin Mr 316	kvercetin 3,3'-dimethyl- ether Mr	eriodictyol Mr 288
1	lipový	+	+	+	+	+
2	květový (šlehaný)	+	+/-	+	-	+
3	květový (šlehaný)	+/-	+	+/-	+/-	+
4	slunečnicový	-	+	-	+	+
5	řepkový (natural)	+	+	+	-	+
6	řepkový (pastovaný)	-	+	+	+	+
7	luční (květový)	-	-	-	+	+
8	lesní (květový smíšený)	-	+	+	+	+
9	luční (květový)	+	+	+	+	+
10	lesní	+/-	+	+/-	-	+
11	květový smíšený	+/-	+/-	+/-	+/-	+
12	s tymiánem a bylinami	+	+	+/-	+	+
13	akátový	+/-	+/-	+	-	+
14	mateří kašička v medu	-	+/-	+/-	+	+
15	luční (z lučních květů)	-	+/-	+/-	-	+
16	med z eukalyptových květů	-	+	+	-	+
17	luční	-	+/-	+	+/-	+
18	akátový	+	+	+/-	+/-	+
19	med z pomerančových květů	+/-	+/-	+/-	+/-	+
23	„včelí mystérium“	+/-	+	+/-	+	+
24	pohankový	+/-	+	+	+/-	+
25	maliníkový	+/-	-	+/-	-	+
26	ostropetřec mariánský	+/-	-	+/-	-	+/-
27	květový	+	+	+/-	+	+
28	medovicový	-	+/-	-	+	-
29	propolis	+	+	+	+/-	+/-
30	směs připravená v laboratoři	-	+	+/-	+/-	+

Pouze identifikace; +...jednoznačně přítomen; -...jednoznačně nepřítomen; +/-...přítomnost nelze vyloučit

6.3.9 Stanovení obsahu hydroxymethylfurfuralu pomocí metody HPLC

Hydroxymethylfurfural byl analyzován zejména za účelem posouzení změn v průběhu dlouhodobého uchovávání. Hladiny HMF byly stanoveny podle postupu viz kapitola (4.4.8).

Měření bylo provedeno třikrát. Ze získaných hodnot byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Tab. 43: Kalibrační závislost pro výpočet obsahu HMF.

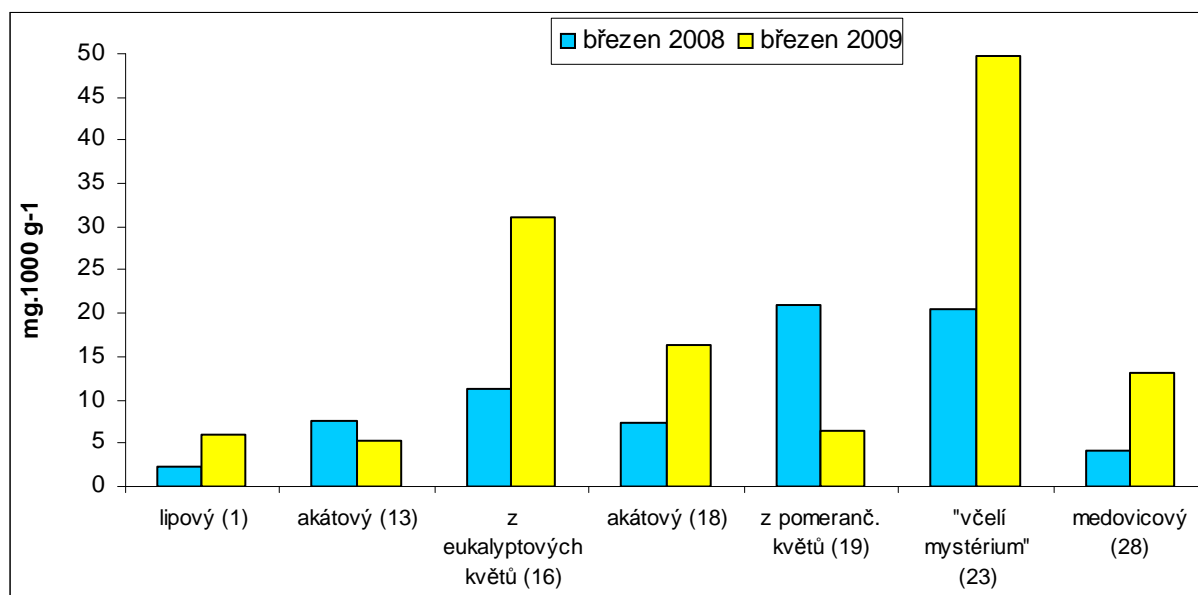
Látka	Kalibrační závislost	Regresní koeficient
HMF	$y = 397,13x$	$R^2 = 0,9999$

Tab. 44: Stanovení obsahu hydroxymethylfurfuralu.

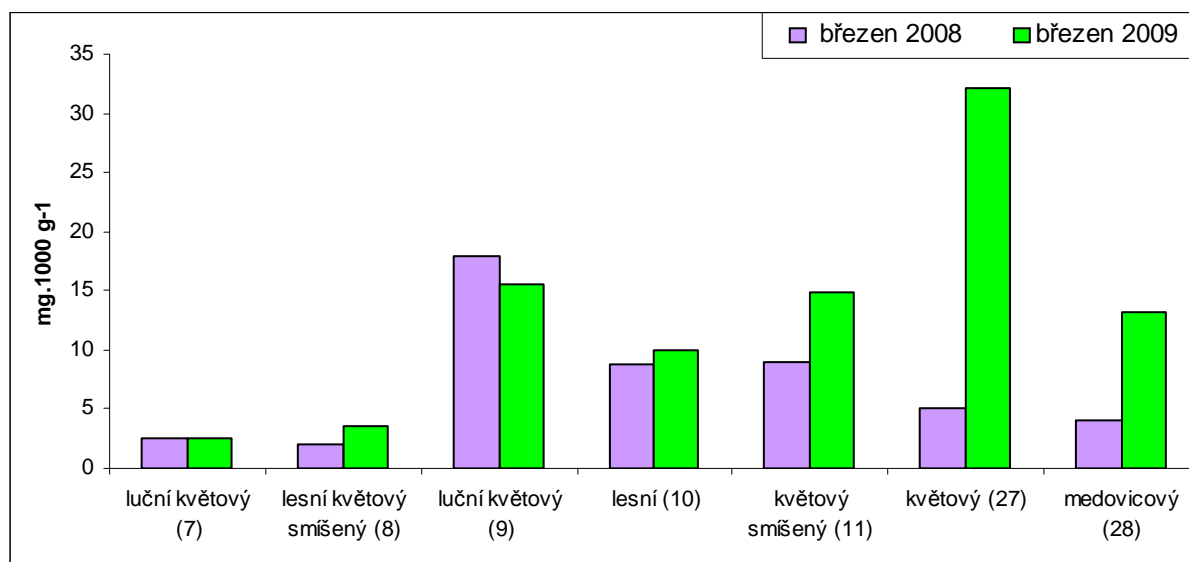
č.	Druh medu	HMF [mg.100 g ⁻¹] březen 2008	HMF [mg.100 g ⁻¹] březen 2009	Přírůstek [%]	Relativní zvýšení obsahu HMF (násobek)
1	lipový	0,24 ± 0,00	0,59 ± 0,01	145,47	2,45
2	květový (šlehaný)	0,52 ± 0,01	0,65 ± 0,01	25,91	1,26
3	květový (šlehaný)	1,46 ± 0,00	2,80 ± 0,02	91,49	1,91
4	slunečnicový	3,09 ± 0,00	3,62 ± 0,02	17,18	1,17
5	řepkový (natural)	0,23 ± 0,01	0,70 ± 0,00	202,19	3,02
6	řepkový (pastovaný)	0,38 ± 0,00	1,12 ± 0,01	194,68	2,95
7	luční (květový)	0,26 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,80	1,01
8	lesní (květový smíšený)	0,20 ± 0,00	0,36 ± 0,00	79,65	1,80
9	luční (květový)	1,79 ± 0,01	1,55 ± 0,01	-13,27	0,87
10	lesní	0,88 ± 0,00	0,99 ± 0,01	12,87	1,13
11	květový smíšený	0,89 ± 0,02	1,49 ± 0,02	67,51	1,68
12	s tymiánem a bylinami	4,06 ± 0,00	4,84 ± 0,02	19,23	1,19
13	akátový	0,76 ± 0,01	0,52 ± 0,00	-31,83	0,68
14	mateří kašička v medu	0,56 ± 0,00	0,84 ± 0,00	50,41	1,50
15	luční (z lučních květů)	1,64 ± 0,01	2,44 ± 0,01	48,61	1,49
16	med z eukalyptových květů	1,13 ± 0,00	3,12 ± 0,01	175,76	2,76
17	luční	1,63 ± 0,00	2,15 ± 0,02	32,09	1,32
18	akátový	0,73 ± 0,00	1,63 ± 0,00	123,94	2,24
19	med z pomerančových květů	2,09 ± 0,01	0,64 ± 0,00	-69,48	0,31
23	„včelí mystérium“	2,04 ± 0,01	4,98 ± 0,03	143,95	2,44
24	pohankový	0,66 ± 0,00	3,19 ± 0,01	383,83	4,84

25	maliníkový	$0,38 \pm 0,00$	$3,02 \pm 0,04$	694,51	7,95
26	ostropestřec mariánský	$1,37 \pm 0,00$	$2,68 \pm 0,01$	95,79	1,96
27	květový	$0,50 \pm 0,02$	$3,21 \pm 0,02$	542,91	6,43
28	medovicový	$0,41 \pm 0,00$	$1,32 \pm 0,00$	222,21	3,22
29	propolis	-	ND	-	-
30	směs připravená v laboratoři	$0,46 \pm 0,01$	$1,85 \pm 0,02$	302,61	4,03

Poznámka pro tabulku 44: ND = látka HMF nebyla ve vzorku propolisu stanovována



Graf 30: Obsah hydroxymethylfurfuralu ve vybraných vzorcích medu (skupina 1).



Graf 31: Obsah hydroxymethylfurfuralu ve vybraných vzorcích medů (skupina 2).

Obsah hydroxymethylfurfuralu se pohyboval v rozmezí (0,26 - 4,98) mg.100 g⁻¹ medu. Nejvyšší obsah HMF byl zjištěn u medu „včelí mystérium“. Druhý nejvyšší obsah HMF měl

med s tymiánem a bylinami (12), 4,84 mg.100 g⁻¹. Vysoký obsah HMF může být jedním z důvodu nízké antimutagenní aktivity tohoto druhu medu. Vzhledem k tomu, že legislativa [10] povoluje nejvýše 40 g HMF.1 000 g⁻¹ medu, oba tyto medy tedy překročily povolený limit. Nejnižší obsah byl změřen u medu lučního květového (7). Druhou nejnižší hodnotu obsahu HMF měl med lesní květový smíšený (8). Oba medy vykazovaly relativně vysokou antimutagenní kapacitu.

V porovnání s hodnotami naměřenými v březnu 2008 [47] byl obsah HMF vyšší u většiny medů. Nižší hodnoty byly zjištěny pouze u medu lučního květového (9), akátového (13) a medu z pomerančových květů (9). K nejmenšímu nárůstu došlo u medu lučního květového (7), pouze o 0,8 %. Největší nárůst byl zjištěn u medu malinického (25), obsah HMF se zvýšil cca 8krát.

6.3.10 Stanovení obsahu vybraných sacharidů

Obsah vybraných sacharidů v medech byl stanoven za účelem charakterizace jednotlivých druhů medu podle postupu viz kapitola (4.4.9).

Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, z naměřených hodnot byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tab. 45: Kalibrační závislosti pro výpočty obsahů sacharidů.

Látka	Kalibrační závislost	Regresní koeficient
fruktóza	$y = 908,6 x$	$R^2 = 0,9483$
glukóza	$y = 765,9 x$	$R^2 = 0,9883$
sacharóza	$y = 1359,2 x$	$R^2 = 0,9999$
melezitóza	$y = 1018,2 x$	$R^2 = 0,9934$
maltóza	$y = 721,15 x$	$R^2 = 0,9364$

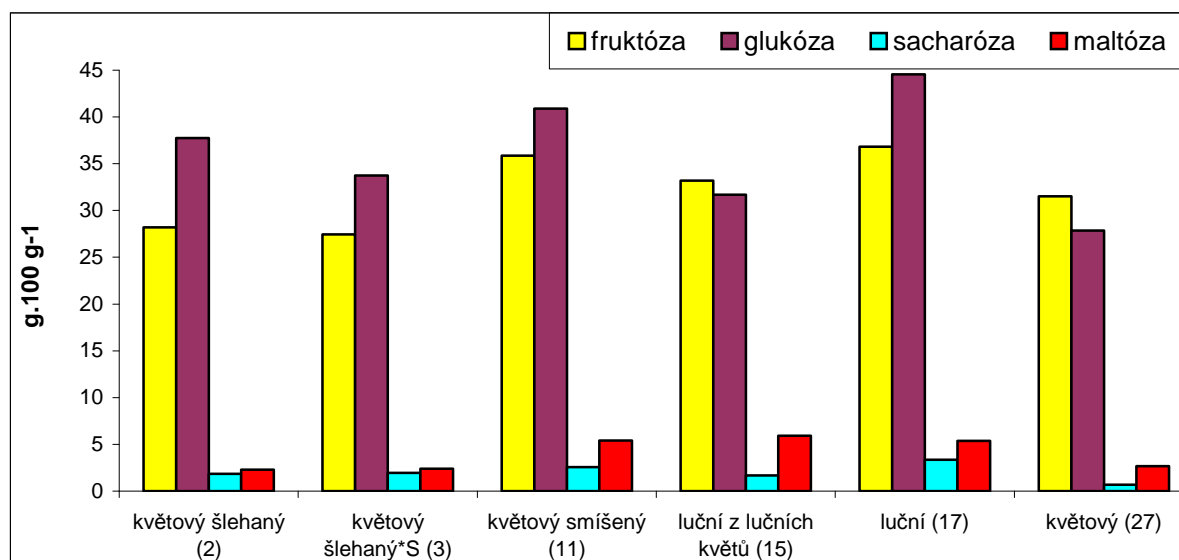
Tab. 46: Obsah fruktózy, glukózy, sacharózy a maltózy v analyzovaných medech a v propolisu.

č.	Druh medu	fruktóza [g.100 g ⁻¹]	glukóza [g.100 g ⁻¹]	sacharóza [g.100 g ⁻¹]	maltóza [g.100 g ⁻¹]
1	lipový	28,52 ± 0,12	34,92 ± 0,24	2,51 ± 0,01	4,19 ± 0,32
2	květový (šlehaný)	28,20 ± 0,13	37,73 ± 0,28	1,85 ± 0,00	2,29 ± 0,19
3	květový (šlehaný)* D	22,06 ± 0,11	41,10 ± 0,31	1,73 ± 0,03	2,17 ± 0,16
	květový (šlehaný)* S	27,45 ± 0,14	33,75 ± 0,28	1,94 ± 0,02	2,39 ± 0,21
	květový (šlehaný)* V	41,58 ± 0,31	20,51 ± 0,11	2,73 ± 0,06	3,22 ± 0,24
4	slunečnicový	x	x	x	x
5	řepkový (natural)	26,82 ± 0,31	42,28 ± 0,27	1,94 ± 0,10	1,86 ± 0,09
6	řepkový (pastovaný)	34,33 ± 0,22	50,06 ± 0,31	2,40 ± 0,11	2,99 ± 0,11
7	luční (květový)	31,67 ± 0,21	21,66 ± 0,09	1,01 ± 0,05	3,71 ± 0,24
8	lesní (květový smíšený)	26,70 ± 0,12	22,80 ± 0,13	0,66 ± 0,00	2,44 ± 0,12
9	luční (květový)	29,15 ± 0,04	24,55 ± 0,07	2,43 ± 0,12	3,53 ± 0,18
10	lesní	35,10 ± 0,17	30,33 ± 0,13	1,68 ± 0,01	6,36 ± 0,25
11	květový smíšený	35,85 ± 0,26	40,90 ± 0,26	2,55 ± 0,02	5,42 ± 0,23
12	s tymiánem a bylinami	32,76 ± 0,21	27,00 ± 0,18	1,50 ± 0,03	5,9 ± 0,20
13	akátový	33,56 ± 0,12	26,38 ± 0,06	2,18 ± 0,01	3,55 ± 0,16

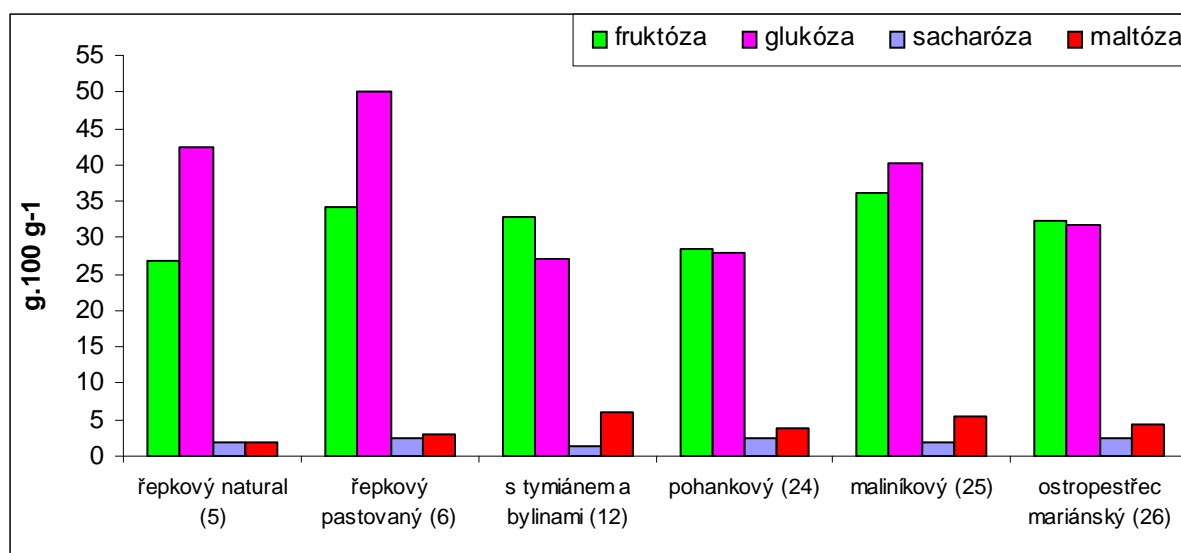
14	mateří kašička v medu	34,00 ± 0,28	34,99 ± 0,17	0,82 ± 0,00	0,67 ± 0,02
15	luční (z lučních květů)	33,20 ± 0,46	31,68 ± 0,24	1,68 ± 0,01	5,92 ± 0,33
16	med z eukalyptových květů	22,69 ± 0,16	18,35 ± 0,09	1,06 ± 0,01	1,66 ± 0,04
17	luční	36,82 ± 0,13	44,56 ± 0,19	3,34 ± 0,02	5,38 ± 0,21
18	akátový	34,19 ± 0,21	23,82 ± 0,11	1,93 ± 0,13	1,37 ± 0,06
19	med z pomerančových květů	36,18 ± 0,13	30,38 ± 0,12	1,01 ± 0,07	1,54 ± 0,16
23	„včelí mystérium“	30,01 ± 0,17	21,97 ± 0,06	1,25 ± 0,06	2,48 ± 0,13
24	pohankový	28,38 ± 0,07	27,97 ± 0,17	2,38 ± 0,02	3,95 ± 0,19
25	maliníkový	36,02 ± 0,26	40,17 ± 0,23	1,80 ± 0,20	5,55 ± 0,24
26	ostropestřec mariánský	32,34 ± 0,16	31,79 ± 0,13	2,39 ± 0,20	4,31 ± 0,18
27	květový	31,51 ± 0,21	27,87 ± 0,15	0,70 ± 0,00	2,67 ± 0,17
28	medovicový	23,43 ± 0,17	44,63 ± 0,17	1,08 ± 0,10	2,71 ± 0,14
29	propolis	17,75 ± 0,05	17,38 ± 0,07	ND	ND
30	směs připravená v laboratoři	30,22 ± 0,16	33,22 ± 0,19	1,16 ± 0,21	3,14 ± 0,20

Poznámka pro tabulku 46: x - med E nebyl proměřen

- sacharóza u vzorku propolisu nebyla identifikována.



Graf 32: Obsah analyzovaných sacharidů ve vybraných vzorcích medů (skupina 3).



Graf 33: Obsah analyzovaných sacharidů ve vybraných vzorcích medů (skupina 4).

Obsah fruktózy v analyzovaných medech se pohyboval v rozmezí (22,06 - 41,58) g.100 g⁻¹ medu. Nejvyšší a také nejnižší hladina fruktózy byla naměřena u květového šlehaného medu (vz. 3), viz níže. Glukóza se v analyzovaných medech vyskytovala v množství (18,35 - 50,06) g.100⁻¹ medu. Nejméně bylo glukózy v medu z eukalyptových květů (16), nejvíce v medu řepkovém pastovaném (6). Obsah sacharózy se pohyboval v rozmezí (0,66 - 3,34) g.100⁻¹ medu. Nejméně sacharózy obsahoval med lesní květový smíšený (8), naopak nejvíce luční med s označením bio (17). Maltóza se vyskytovala v medech v rozmezí (0,67 - 6,36) g.100 g⁻¹. Nejméně jí bylo v mateří kašičce v medu (14). Nejvíce se nacházela v lesním medu (10).

V medovicovém medu (28) byl také identifikován sacharid melezitóza a to v množství 4,94 g.100 g⁻¹ (v tabulce není uvedeno). Výskyt tohoto sacharidu je typický právě u medovicových medů, viz kapitola (3.4.1). Vzorek propolisu obsahoval 17,75 g.100 g⁻¹ fruktózy a 17,38 g glukózy.100⁻¹. Sacharóza a maltóza nebyla u propolisu identifikována.

Květový med šlehaný (3) je med se zřetelně oddělenou glukózovou a fruktózovou vrstvou. Obě tyto vrstvy byly proměřeny zvlášť a dále jejich směs v poměru přibližně 1:1. Ve spodní vrstvě byl naměřen obsah glukózy 41,10 g.100 g⁻¹ medu, což je dvojnásobné množství obsahu fruktózy v této vrstvě, 22,06 g.100 g⁻¹ medu. V horní vrstvě byl obsah fruktózy 41,58 g.100 g⁻¹ medu a obsah glukózy byl poloviční, tedy 20,51 g.100 g⁻¹ medu. Ve směsi obou vrstev byl obsah cukrů podobný, glukózy 33,74 g.100 g⁻¹ medu, fruktózy 27,45 g.100 g⁻¹ medu. Vyšší obsah fruktózy nad glukózou způsobuje v medech zpomalení, popřípadě oddálení nástupu zcukernatění, viz kapitola (3.15).

Ze srovnání výsledků zastoupení jednotlivých sacharidů s antimutagenními a anti-oxidačními vlastnostmi medů je patrné, že jistou souvislost lze nalézt s obsahem maltózy, případně součtu obsahu maltózy a glukózy, což jsou oba redukující cukry. Medy s vysokým obsahem maltózy vykazují vysokou antioxidační (med lipový (1), směsný květový (11), pohankový (24), maliníkový (25), med s přídavkem ostropestřce (26)) a většinou i antimutagenní aktivitu (medovicový med (28)).

7 ZÁVĚRY

- Předložená diplomová práce navazuje na pilotní studii analyzující obsah aktivních látek ve vybraných druzích medů a ve vzorku propolisu. Cílem této práce bylo studium antimutagenních vlastností daných vzorků a hledání souvislosti mezi obsahem látek s antioxidačním efektem a biologickými účinky medu. Součástí práce bylo i sledování změn obsahu aktivních látek v průběhu dlouhodobého uchovávání medu.
- Obsah celkových polyfenolů a celkových flavonoidů byl stanoven pomocí spektrofotometrie. Celková antioxidační kapacita byla stanovena metodou ABTS. Obsah kyseliny askorbové byl stanoven titračně. Pomocí metody RP-HPLC byl kvantitativně stanoven obsah α - a β -karotenu, α -tokoferolu a luteinu. Dále byl pomocí HPLC/UV-VIS stanoven obsah individuálních katechinů, flavonoidů a hydroxymethylfurfuralu. Metodou HPLC/RI byl ve všech vzorcích analyzován obsah sacharidů. Metodou LC-MS/ESI byly identifikovány flavonoidy a semikvantitativně stanoveno jejich zastoupení. Antimutagenní aktivita vzorků byla testována na jednobuněčném eukaryotickém systému *Saccharomyces cerevisiae* D7. Orientačně byla stanovena mikrobiální kontaminace medů.
- Antimutagenní aktivita na kvasince *Saccharomyces cerevisiae* D7 byla testována pro dvě různé koncentrace roztoku medu. Nejvyšší hodnoty antimutagenního účinku a současně nejvyšší stabilita hodnot byla nalezena u více druhů směsných květových medů (vz. 9, 11, 27), u řepkového medu (6), u medu z eukalyptových (16) a pomerančových květů (19) a u medů maliníkového (25) a medovicového (28). Neprůkazné hodnoty či dokonce příspěvek k účinku standardního mutagenu byl prokázán u akátového medu (13), medu s ostropestřcem (26) a u přípravků s mateří kašičkou (vz. 14, 23). Medy získané v obchodní síti vykazovaly většinou nižší hodnoty antimutagenity než medy pořízené u včelaře
- Analýza celkových polyfenolů a celkových flavonoidů byla provedena dvakrát (v listopadu 2008 a dubnu 2009). Ze srovnání s výsledky předešlé práce bylo možné vyhodnotit změny v průběhu dlouhodobého skladování medů (20°C, tma). Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl změřen u medu s přídavkem mateří kašičky (14) a nejmenší u akátového medu (18, 21). Nejvyšší obsah celkových flavonoidů vykazoval pohankový med (24), med z eukalyptových květů (16). V průběhu skladování dochází k významným ztrátám obsahu celkových polyfenolů (50-70 %), kdežto obsah celkových flavonoidů je velmi stabilní a v průběhu skladování se obsah téměř nemění. Celkové flavonoidy se na obsahu celkových polyfenolů v medu podílejí jen velmi malou částí. Medy s vysokou hodnotou antimutagenity obsahují také vyšší obsah polyfenolů a především flavonoidů. Přímá korelace však nebyla prokázána, poněvadž se jedná o skupinové parametry ovlivňované mnoha dalšími faktory.
- Celková antioxidační kapacita v medech a propolisu vykazovala v průběhu skladování u většiny vzorků pokles. Větší antioxidační aktivitu vykazují jednodruhové medy než

medy směsné. Velmi vysokou aktivitu vykazoval med s přidavkem mateří kašičky, na této skutečnosti se patrně podílela kyselina askorbová přidána jako konzervant (deklarováno na obale). Vyšší antioxidační aktivitu obecně vykazují medy s vysokým obsahem celkových polyfenolů a celkových flavonoidů, korelace mezi těmito parametry však nebyla prokázána. Rovněž nebyla prokázána korelace mezi antioxidační kapacitou a antimutagenním účinkem, poněvadž k hodnotě obou parametrů přispívá kromě antioxidantů i řada dalších látek.

- Obsah kyseliny askorbové byl titračně stanoven v rozmezí (0,50 - 6,86) mg.100 g⁻¹ medu. Nejméně kyseliny askorbové obsahoval med akátový (21), nejvyšší obsah byl u medu pohankového (24). Vyšší nebo dlouhodobě stabilní hodnoty byly nalezeny ve vzorcích s vysokou hladinou TAS. Lze předpokládat, že askorbát je hlavním faktorem přispívajícím k vysoké hladině TAS, avšak nemusí být nutně nejvýznamnější složkou medu přispívající k jeho antimutagennímu účinku. Vysokou antimutagenitu vykazují spíše medy se střední stabilní hodnotou askorbátu - luční a květové směsi, eukalyptový (16), pomerančový (19) a maliníkový med (25); vyšší hodnotu askorbátu a současně vyšší antimutagenitu vykazuje medovicový med (28).
- Obsah lipofilních antioxidantů v medu je relativně nízký a v průběhu skladování dochází k jejich postupnému úbytku. Rovněž obsah individuálních flavonoidů (RP-HPLC/UV-VIS) u některých medů klesal, u jiných však hladiny zůstaly zachovány. Katechiny a epikatechiny či jejich galláty a kyselina chlorogenová byly nalezeny prakticky u všech druhů medu, v průběhu skladování došlo spíše k jejich úbytku, hlavně u jednodruhových medů (př. 24, 25). Flavonoidy rutin, myricetin, morin, kvercetin a kaempferol byly rovněž detekovány ve všech medech, naringenin a luteolin ve většině a apigenin byl identifikován jen u poloviny analyzovaných medů. Srovnáním hodnot měřených přibližně před 12 měsíci je vidět že v jednotlivých medech dochází k menším či větším změnám individuálních flavonoidů, jako celek se však jejich obsah výrazně neměnil a zůstává zachován po delší dobu.
- Pro podrobnější identifikaci flavonoidů v medech byla použita metoda LC-MS/ESI. Srovnáním s výsledky získanými pomocí HPLC-UV/VIS byly zjištěny jisté rozdíly v identifikaci i kvantifikaci jednotlivých fenolických látek, což je způsobeno koelucí řady látek současně s flavonoidy u HPLC/UV-VIS a tím zkreslením výsledků.
- Obsah hydroxymethylfurfuralu ve vzorcích medů se v průběhu dlouhodobého uchovávání postupně zvyšoval u většiny medů. K minimální změně došlo pouze u medu lučního květového (9), akátového (13) a medu z pomerančových květů (19). Med s tymiánem a bylinami (12) překročil povolený limit. U tohoto medu může vysoký obsah HMF souviset s nízkou hodnotou antimutagenity.
- Metodou HPLC/RI byly v medech analyzovány sacharidy, fruktóza, glukóza, sacharóza, maltóza a melezitóza. Melezitóza byla identifikována pouze u medovicového medu (28), pro nějž je typická. Medy s vyšším obsahem maltózy a glukózy vykazovaly vyšší antimutagenitu i antioxidační kapacitu.

- Srovnáním obsahu biologicky aktivních látek mezi jednotlivými medy je možné najít jisté rozdíly, nejsou však významné a charakteristické pro určitý druh medu. Obecně více aktivních látek obsahují jednodruhové medy, med pohankový (24), z eukalyptových květů (16) apod. a také med medovicový (28). Naopak velmi málo aktivních látek bylo nalezeno v akátových medech. Vyšší antimutagenní účinek vykazovaly medy zakoupené přímo od včelaře. V průběhu skladování došlo k nepřilíš významným změnám v obsahu většiny aktivních látek, medy tedy lze považovat za potravinu, která si zachovává po delší dobu své zdraví prospěšné vlastnosti.

8 LITERATURA

- [1] MALACHOVÁ, K. Mutagenita a karcinogenita kontaminant životního prostředí : Spisy přírodovědecké fakulty ostravské univerzity. 1. vyd. Ostrava : OFTIS, 1993. 110 s. ISBN 80-7042-707-8.
- [2] Šilhánková, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd., Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [3] VAŠKOVÁ, D. Medová knížka: příloha časopisu Menu. 1992. 32 s.
- [4] VORLOVÁ, L. et al. Med : Souborná analýza. 1. vyd. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2002. 67 s. ISBN 80-7305-450-7.
- [5] PŘIDAL, A. Včelí produkty. 1. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 102 s. ISBN 80-7175-717-0.
- [6] THUMA, A. Med a jeho využití v domácnosti. 2. vyd. Knihovna Jana Lernerova v Praze-Podolí, 1920. 104 s.
- [7] BRÍZOVÁ, J. Nezapomínáte na med? Sešity domácího hospodaření. Práce. 1977. 32 s.
- [8] Od včely lesní ke včele domácí. [online]. [cit. 2008-12-12]. Dostupné z [www](http://www.n-vcelari.sk/sal):
<http://www.n-vcelari.sk/sal>
- [9] Steinhauserová I., Simeonovová J., Nápravníková E., Tremlová B., Produkce a zpracování drůbeže, vajec a medu. 1. vyd. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2003. 84 s. ISBN 80-7305-462-0
- [10] Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony.
- [11] Galangin. [online]. [cit. 2009-04-05]. Dostupné z [www](http://www.rchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7828):
http://www.rchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7828
- [12] Pinocembrin. [online]. [cit. 2009-04-05]. Dostupné z [www](http://www.rchemicals.com/chemicals.php?mode=searchname&searchtext=pinocembrin):
<http://www.rchemicals.com/chemicals.php?mode=searchname&searchtext=pinocembrin>
- [13] OMELKA, L. Přednášky z Fyzikální chemie II. FCH VUT Brno
- [14] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 1. 2. upr. vyd. Tábor : OSSIS, 2002. 344 s. ISBN 80-86659-00-3.
- [15] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 2. 2. upr. vyd. Tábor : OSSIS, 2002. 320 s. ISBN 80-86659-01-1.
- [16] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3. 2. upr. vyd. Tábor : OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-01-2.
- [17] PETERSON, J., DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. Nutrition research [online]. 1998, vol. 18, is. 12 [cit. 2009-04-11], s. 1995-2018. ISSN 0271-5317.
- [18] HIGDON, J. Flavonoids. Micronutrient Information Center [online]. 2005 [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www](http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/index.html#intro):
<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/index.html#intro>
- [19] BUHLER, D. R., MIRANDA, C. Antioxidant activities of Flavonoids. 2000 [online]. [cit. 2009-04-17]. Dostupné z [www](http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html):
<http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>
- [20] Coriaria arborea. [online]. 2007. [cit. 2009-02-05]. Dostupné z [www](http://www.oratianatives.co.nz/catalogue_item.php?products_code=CORIARBO):
http://www.oratianatives.co.nz/catalogue_item.php?products_code=CORIARBO
- [21] VYMĚTALOVÁ, V. Biologie pro biomedicínské inženýrství. 1. vyd. Praha : České vysoké učení technické v Praze , 2008. 79 s. ISBN 978-80-01-04013-3.

- [22] SOUKUPOVÁ, M., SOUKUP, F. Kapitoly z lékařské biologie a genetiky II.. 1. vyd. Praha : KAROLINUM - nakladatelství Univerzity Karlovy, 1997. 100 s. ISBN 382-228-97.
- [23] CREIGHTON, T. E. Encyclopedia of Molecular Biology. 1st edition. New York : John Wiley and Sons, 1999. 620 s. ISBN 0471166618.
- [24] KUBEŠOVÁ, J. Využití kvasinkových mikroorganismů k produkci a testování vlastností přírodních látek. Brno, 2006. 152 s. VUT v Brně. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [25] *Saccharomyces cerevisiae*. [online]. [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www: http://www.chateauneuf.dk/artikler/vini15.jpg](http://www.chateauneuf.dk/artikler/vini15.jpg)
- [26] SELECKÝ, R., ŠMOGROVIČOVÁ, D., Mutačné šľachtenie pivovarských kvasiniek pre produkciu nealkoholického piva. Chemické Listy, 2004, roč. 98, č. 8, s. 693.
- [27] ZIMMERMANN, F. K., et.al. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research, 1984, vol 133, no. 3, s. 199 – 244.
- [28] *Euglena gracilis*. [online]. [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www: http://www.nies.go.jp/biology/mcc/images/PCD4212/0133L.jpg](http://www.nies.go.jp/biology/mcc/images/PCD4212/0133L.jpg)
- [29] *Salmonella typhimurium*. [online]. [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www: http://staff.vbi.vt.edu/pathport/pathinfo_images/Salmonella/97198A.jpg](http://staff.vbi.vt.edu/pathport/pathinfo_images/Salmonella/97198A.jpg)
- [30] HLADÍKOVÁ, R. Studium antimutagenních vlastností vybraných přírodních látek. Brno, 2003. 104 s. VUT v Brně. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [31] LI, A.P., HEFLICH, R.H. Genetic toxicology, CRC press. 1991.
- [32] *Drosophilla melanogaster*. [online]. 2006. [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www: <http://www.news.wisc.edu/newsphotos/images/fruit_fly_research03_6801.JPG>](http://www.news.wisc.edu/newsphotos/images/fruit_fly_research03_6801.JPG).
- [33] Chromozom. [online]. [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www: http://www.bioweb.genezis.eu/bunka/cytomorfologia/chromozom.jpg](http://www.bioweb.genezis.eu/bunka/cytomorfologia/chromozom.jpg)
- [34] 4-NQO [online]. [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www: http://www.cancer.gov/templates/db_alpha.aspx?print=1&cdrid=367451](http://www.cancer.gov/templates/db_alpha.aspx?print=1&cdrid=367451)
- [35] 4-nitroquinolin-1-oxide. [online]. [cit. 2009-04-11]. Dostupné z [www: http://www.publink.org/term_view.php?term=4-Nitroquinolin-1-oxide](http://www.publink.org/term_view.php?term=4-Nitroquinolin-1-oxide)
- [36] PERTILE, E. ČABLÍK, V. Instrumentální metody analýzy. 1. vyd. Ostrava : VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
- [37] SOMMER, L. et al. Základy analytické chemie 2. 1. vyd. Brno : VUTIUM, 2000. 348 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [38] SOMMER, L. Základy analytické chemie 1. 1. vyd. Brno : VUTIUM, 1998. 200 s. ISBN 80-214-1300-X.
- [39] MILLER, N.J., RICE-EVANS, C.A. Spectrofotometric determination of antioxidant activity. Redox Report [online]. 1996 [cit. 2009-04-09], s. 161-171.
- [40] Radikál ABTS. [online]. [cit. 2009-04-18]. 2009. Dostupné z [www: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/life/science/biochemicals/migrationbiochemicals1/second-reaction.Par.0001.Image.574.gif](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/life/science/biochemicals/migrationbiochemicals1/second-reaction.Par.0001.Image.574.gif)
- [41] JAMPÍLEK, J., OPATŘILOVÁ, R., LIŠKA, I. Návodů do cvičení z analytické chemie : Vybrané instrumentální metody. 1. vyd. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2007. 74 s. ISBN 978-80-7305-007-8.

- [42] KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2. upr. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [43] VŘEŠŤÁL, J. et al. Hmotnostní spektrometrie. 1. vyd. Brno : Vydavatelství MU, 1998. 114 s. ISBN 80-210-1835-6.
- [44] SÁDECKÁ, J. NETRIOVÁ, J. Analytické metody v klinické chemii 1. 1. vyd. Bratislava : STU v Bratislave, 2008. 270 s. ISBN 978-80-227-2821-8.
- [45] HOLČAPEK, M. et al. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS) : Sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice. 1. vyd. Pardubice : Univerzita Pardubice, 2001. 191 s. ISBN 80-7194-390-8.
- [46] BUŇKOVÁ, R. Studium antimutagenních vlastností vybraných přírodních látek. Brno, 2003. 104 s. VUT v Brně. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [47] JELÉNKOVÁ, Z. Stanovení aktivních látek v medu. Brno 2008. 104 s. VUT v Brně. Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [48] SKUTEK, M. Analýza vybraných biologicky aktivních látek v cereálních výrobcích. Brno 2009. VUT v Brně. Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [49] XIANG, X., et al. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2008 [cit. 2009-05-12], s. 215-219. Dostupný z WWW: www.elsevier.com/locate/foodchem

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

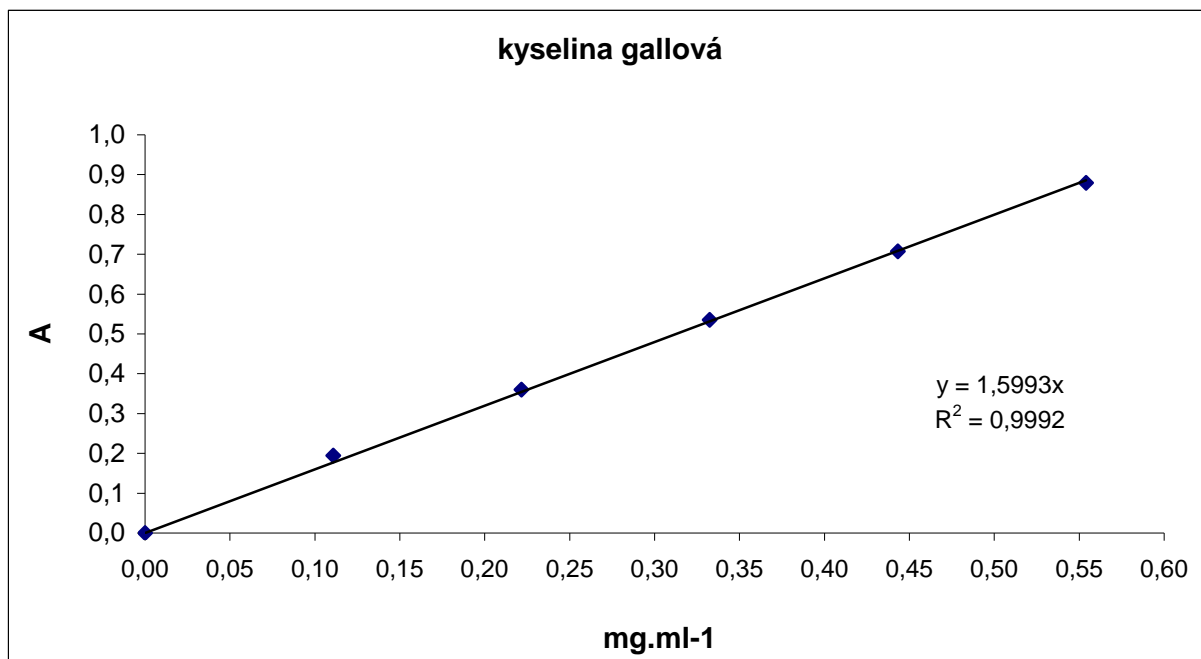
KTJ	kolonie tvořící jednotku
HMF	5-(hydroxymethyl)-furfural
ISO.....	International Standards Organization
EN.....	Evropská norma
ČSN	Česká státní norma
EU.....	Evropská unie
ES	Evropské společenství
HFCS	High Fructose Corn Syrup
HO•.....	hydroxylový radikál
O ₂ • ⁻	superoxidový radikál
¹ O ₂	singletový kyslík
R-O-O•	hydroperoxylový radikál
R-O-OH.....	hydroperoxid
R-O•	alkoxylový radikál
RTG	rentgenové záření
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB.....	polychlorované bifenyly
DNA	deoxyribonukleová kyselina
CAPL.....	cytogenetická analýza periferních lymfocytů
4-NQO	4-nitrochinolin-1-oxid
TAS.....	Total Antioxidant Status
ABTS• ⁺	2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazol-6-sulfonát
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
TEAC.....	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UV	ultrafialová oblast
VIS.....	viditelná oblast
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
RP-HPLC	Reversed-Phase-High Performance Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
YPD	tekuté optimální médium
PDA	photo diode array

10 SEZNAM PŘÍLOH

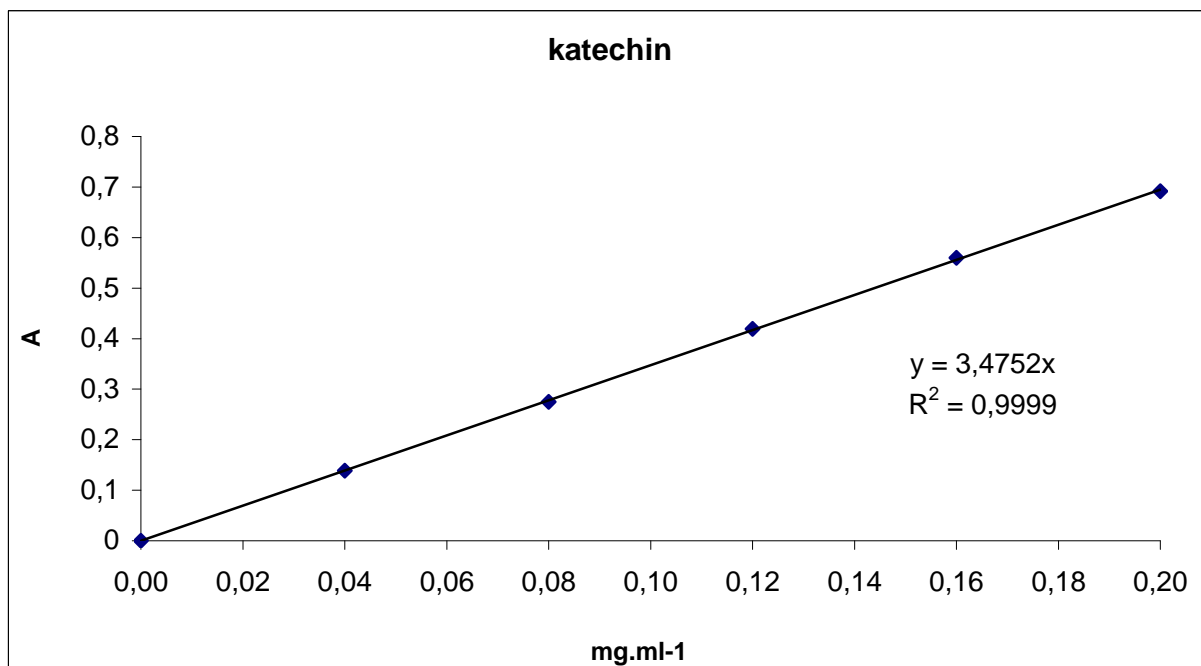
1. Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů.
2. Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů.
3. Chromatogram jednotlivých flavonoidů medu z ostropestřce mariánského (26).
4. Chromatogram jednotlivých flavonoidů ve vzorku propolisu.
5. Chromatogram hydroxymethylfurfuralu v lipovém medu (1).
6. Chromatogram standardu hydroxymethylfurfuralu.
7. Chromatogram katechinů analyzovaných v maliníkovém medu (25).
8. Chromatogram katechinů v květovém šlehaném medu (2).
9. Chromatogram α -tokoferolu v medu s tymiánem a bylinami (12).
10. Hmotnostní spektrum směsného standardu katechinů včetně záznamu z PDA detektoru.
11. Hmotnostní spektrum směsného standardu flavonoidů včetně záznamu z PDA detektoru.
12. Hmotnostní spektrum medu s přídavkem mateří kašičky (14).
13. Hmotnostní spektrum medu s mateří kašičkou (14) - extrakce ethylacetátem.
14. Hmotnostní spektrum medu s mateří kašičkou (14) - extrakce vodou.
15. Hmotnostní spektrum medu z ostropestřce mariánského (25) - extrakce vodou.
16. Hmotnostní spektrum lipového medu (1) - extrakce vodou.
17. Hmotnostní spektrum řepkového medu natural (5) - extrakce ethylacetátem.

11 PŘÍLOHY

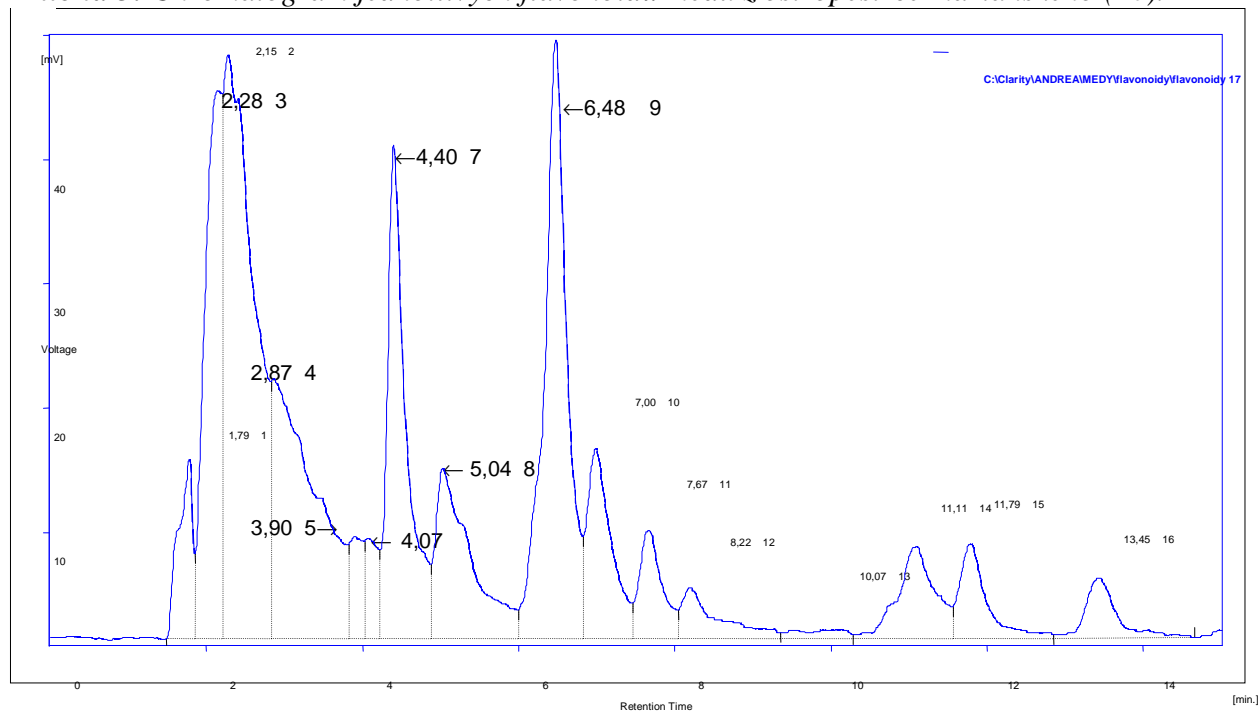
Příloha 1: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů.



Příloha 2: Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů.

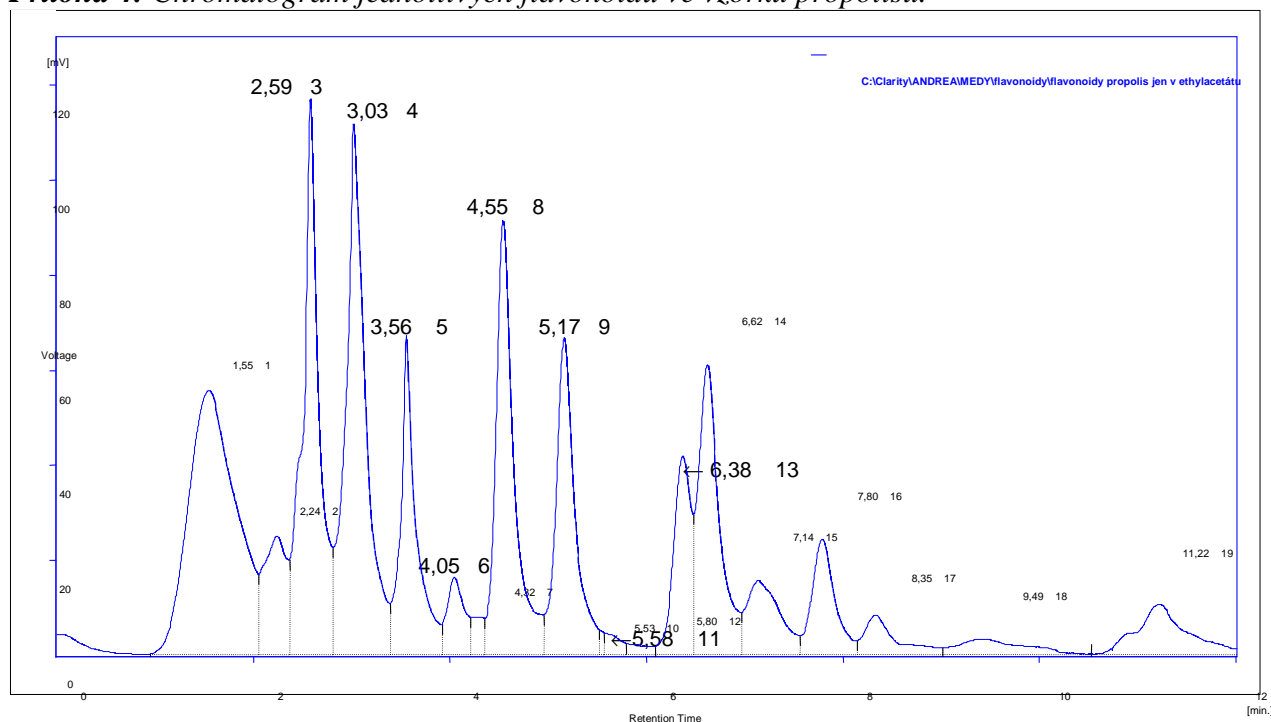


Příloha 3: Chromatogram jednotlivých flavonoidů medu z ostropestřce mariánského (26).



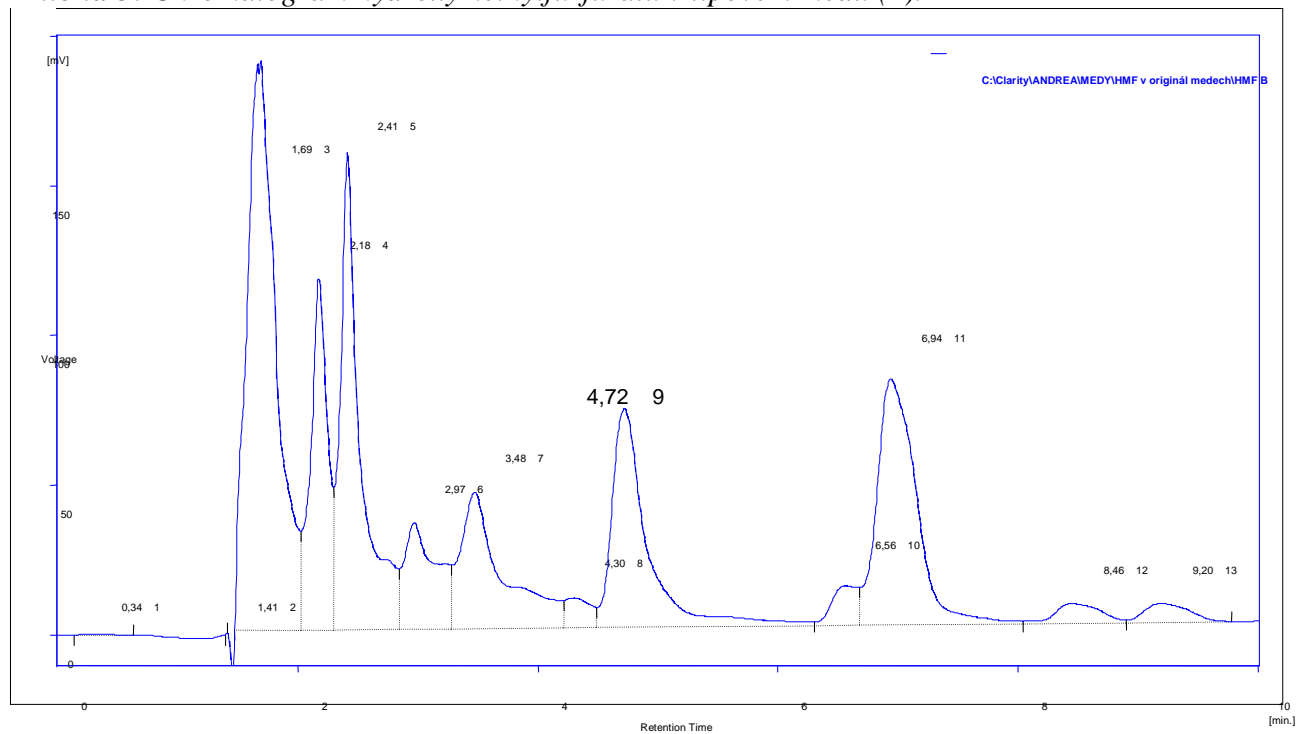
3 - rutin, 4 - myricetin, 5 - morin, 6 - luteolin, 7 - kvercetin, 8 - naringenin, 9 - kaempferol

Příloha 4: Chromatogram jednotlivých flavonoidů ve vzorku propolisu.



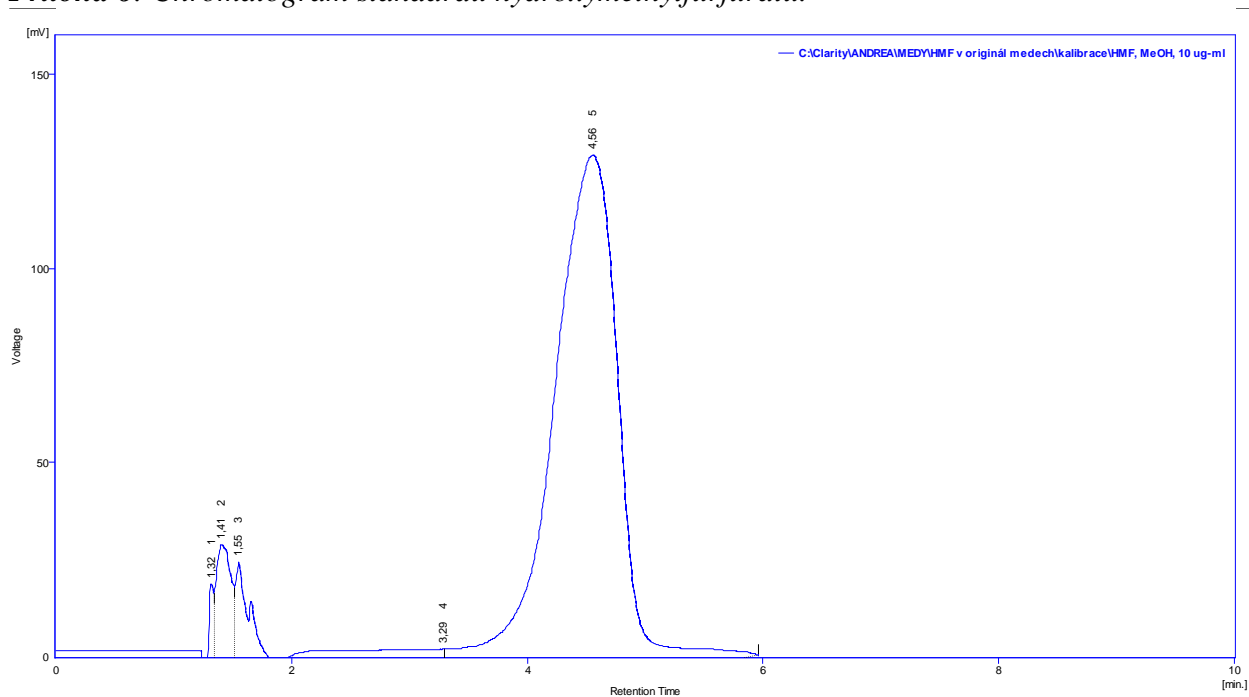
3 - rutin, 4 - myricetin, 5 - morin, 6 - luteolin, 8 - kvercetin, 9 - naringenin, 11 - apigenin, 13 - kaempferol

Příloha 5: Chromatogram hydroxymethylfurfuralu v lipovém medu (1).

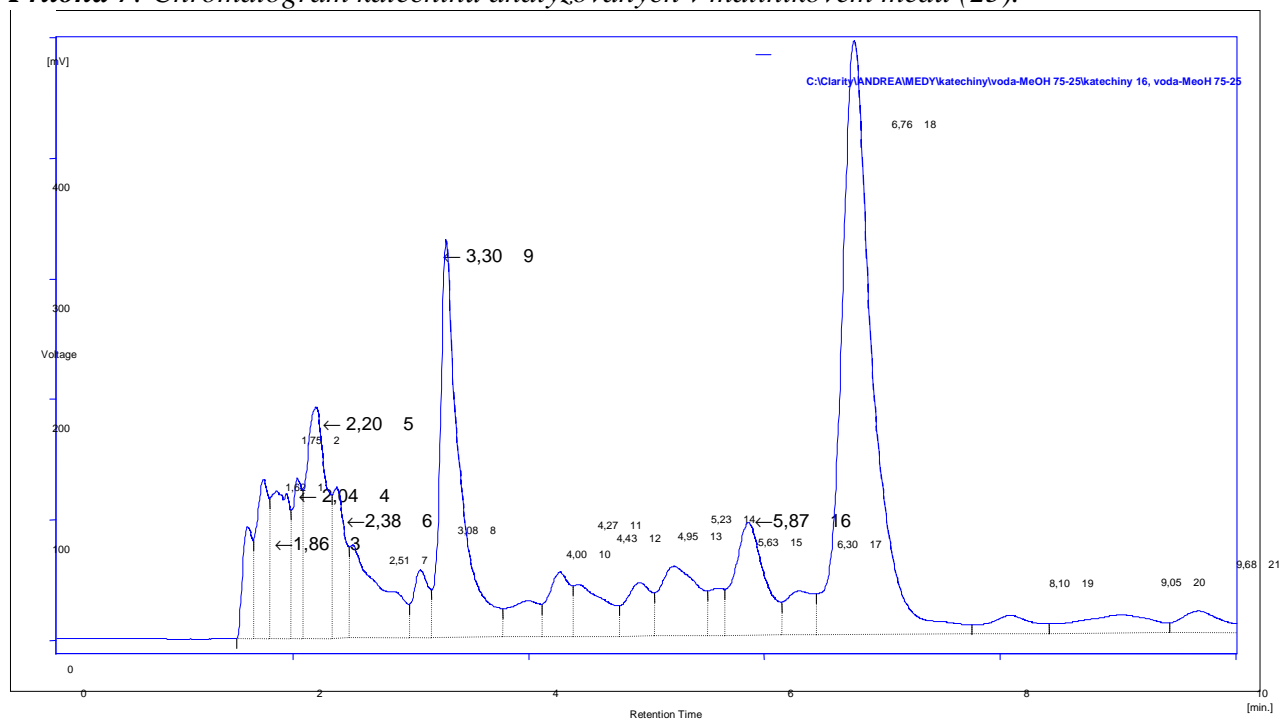


9 - hydroxymethylfurfural

Příloha 6: Chromatogram standardu hydroxymethylfurfuralu.

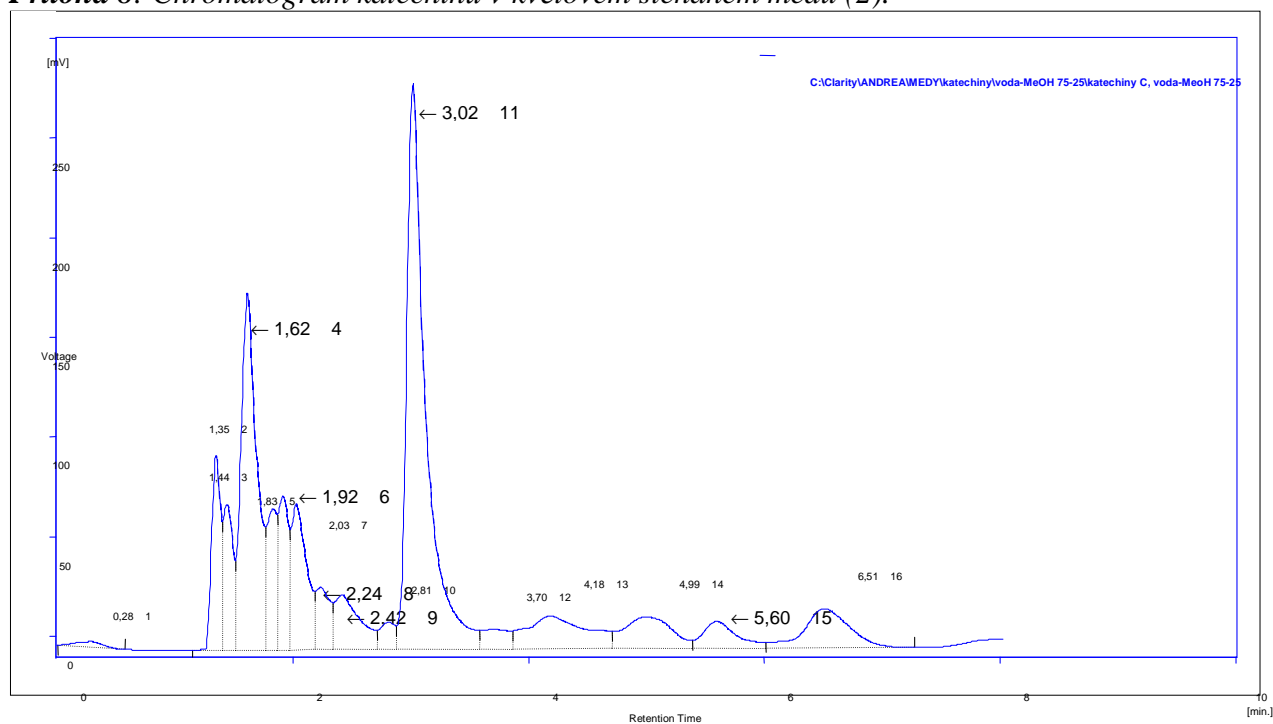


Příloha 7: Chromatogram katechinů analyzovaných v maliníkovém medu (25).



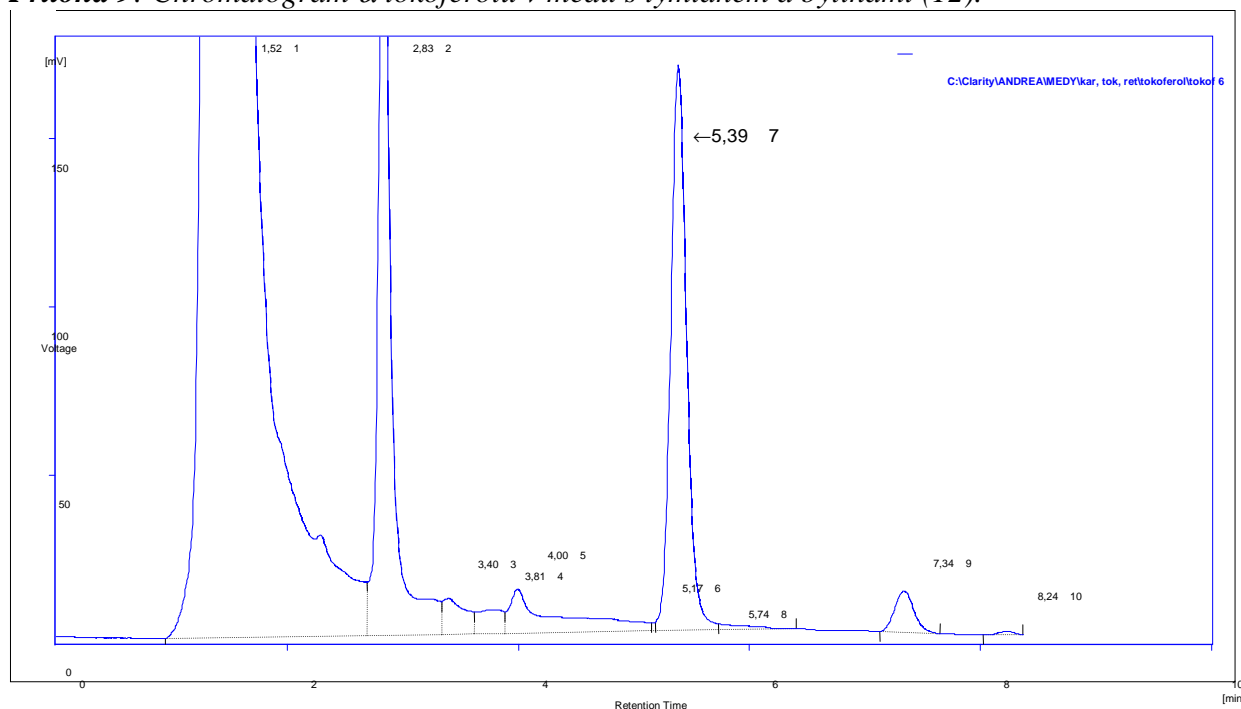
3 - katechin, 4 - epikatechin, 5 - katechin gallát, 6 - epikatechin gallát, 9 - kyselina chlorogenová, 16 - kyselina ferulová

Příloha 8: Chromatogram katechinů v květovém šlehaném medu (2).



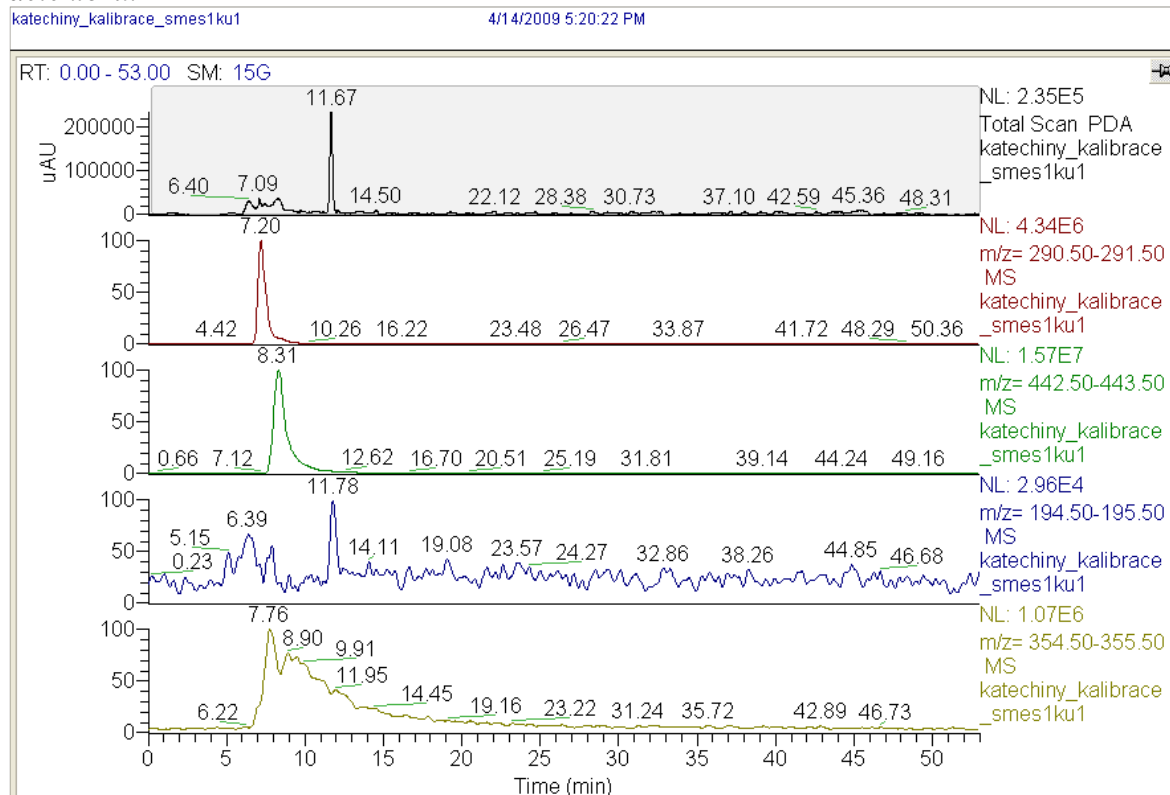
4 - katechin, 6 - epikatechin, 8 - katechin gallát, 9 - epikatechin gallát, 11 - kyselina chlorogenová, 15 - kyselina ferulová

Příloha 9: Chromatogram α -tokoferolu v medu s tymiánem a bylinami (12).

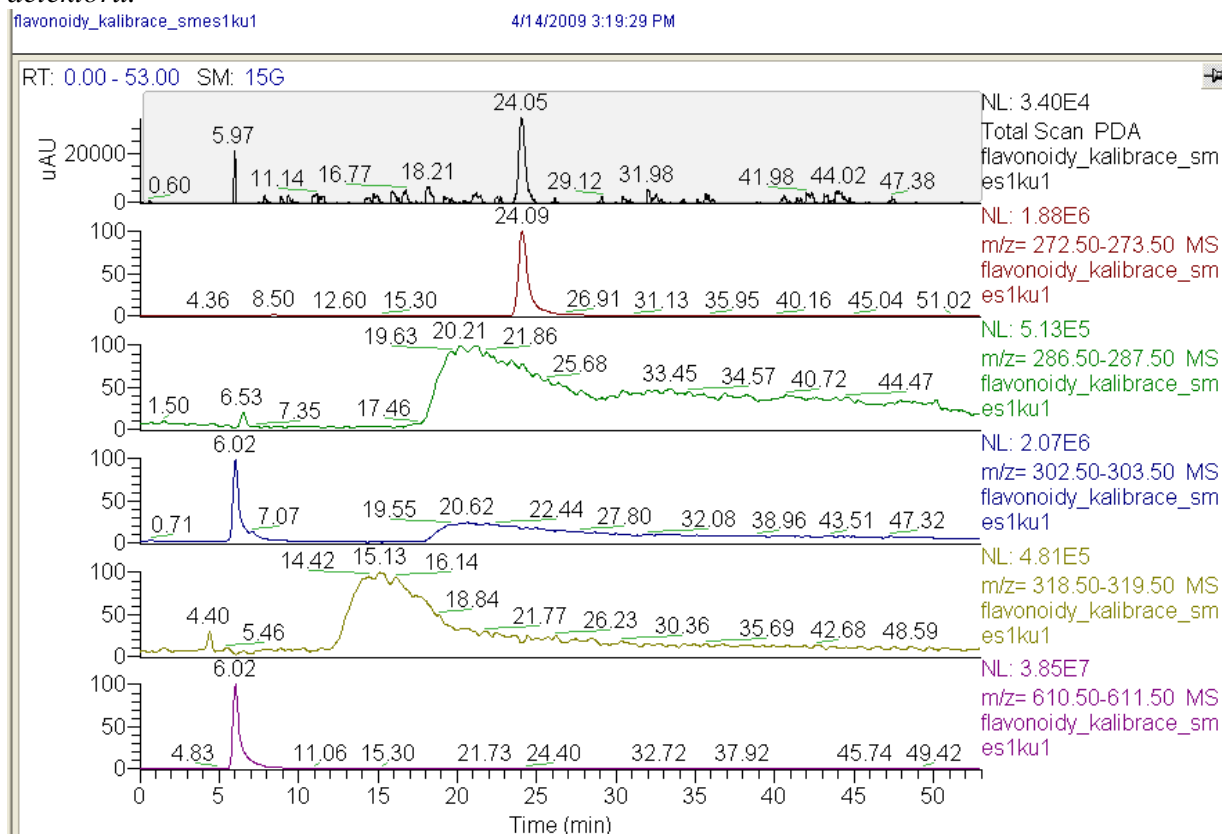


7 - α -tokoferol

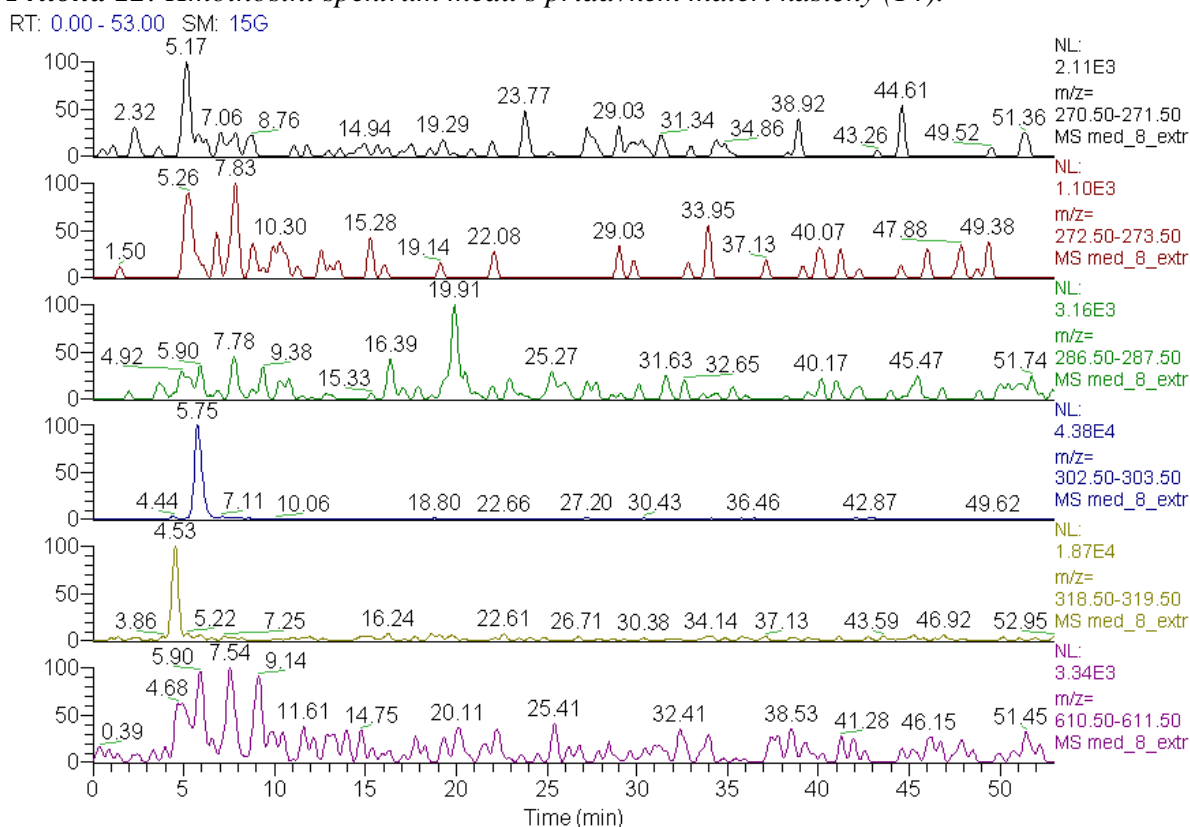
Příloha 10: Hmotnostní spektrum směsného standardu katechinů včetně záznamu z PDA detektoru.



Příloha 11: Hmotnostní spektrum směšného standardu flavonoidů včetně záznamu z PDA detektoru.



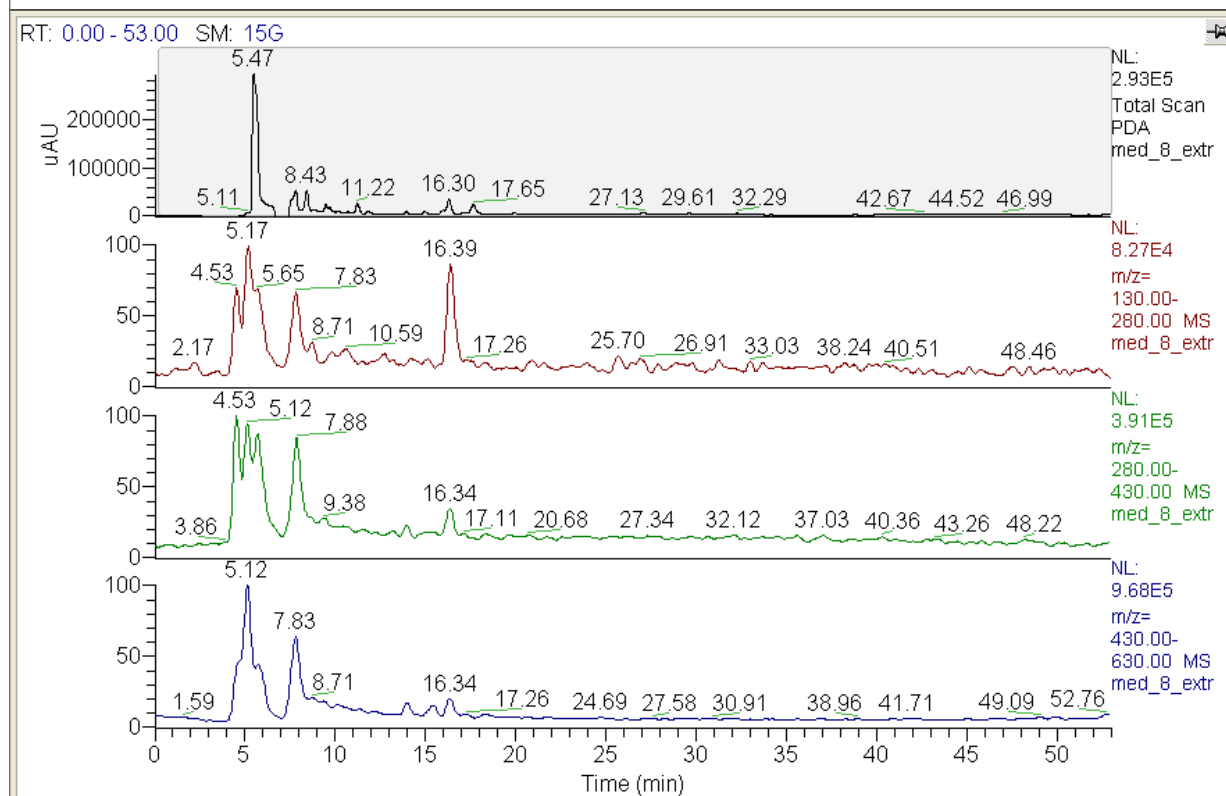
Příloha 12: Hmotnostní spektrum medu s přidavkem materií kašičky (14).



Příloha 13: Hmotnostní spektrum medu s mateří kašičkou (14) - extrakce ethylacetátem.

C:\Xcalibur\data\Aja\med_8_extr

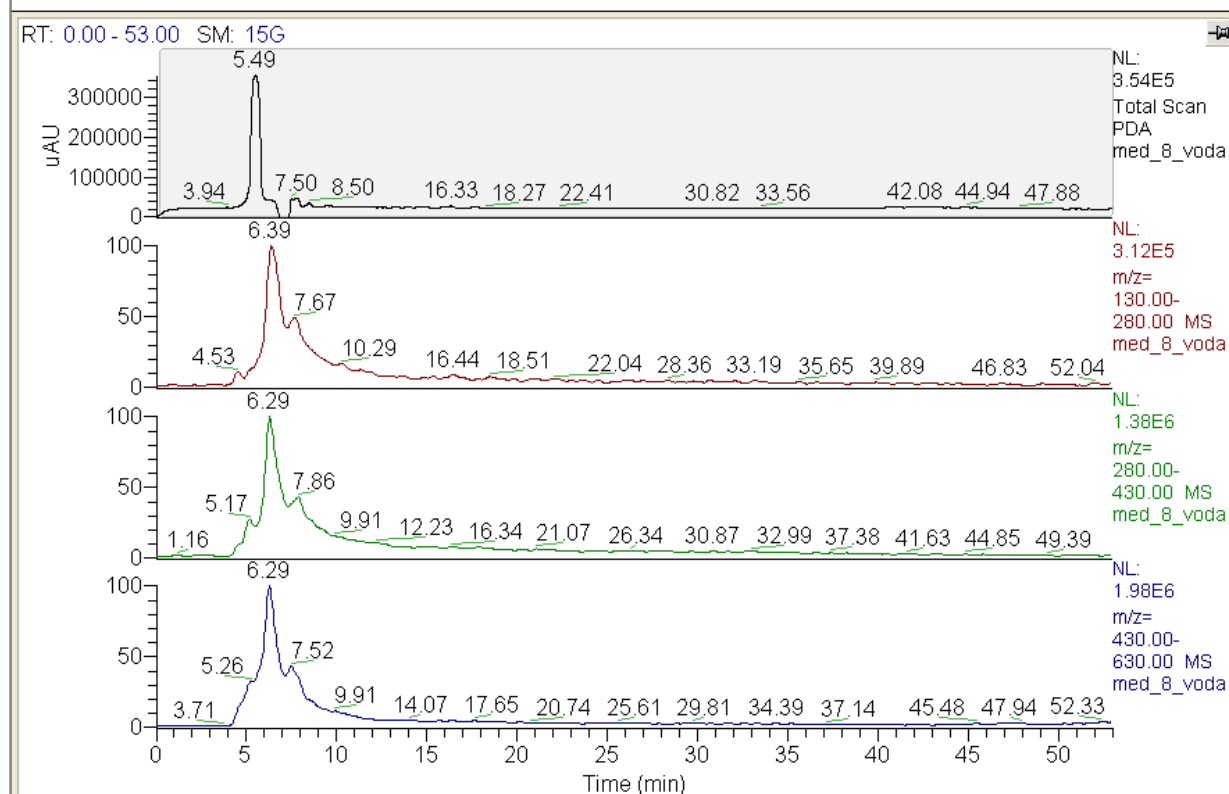
4/5/2009 3:13:29 PM



Příloha 14: Hmotnostní spektrum medu s mateří kašičkou (14) - extrakce vodou.

C:\Xcalibur\data\Aja\med_8_voda

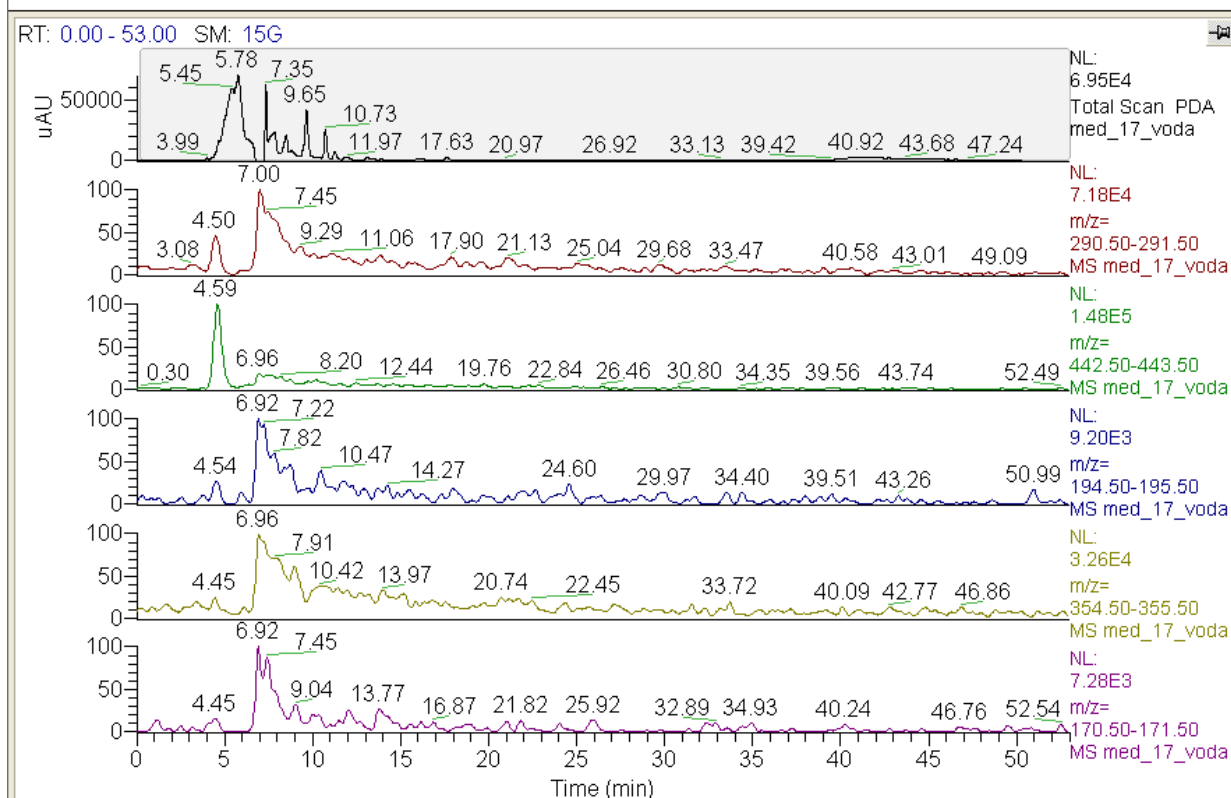
4/5/2009 1:19:52 PM



Příloha 15: Hmotnostní spektrum medu z ostropestřce mariánského (25) - extrakce vodou.

C:\Xcalibur\data\A\med_17_voda

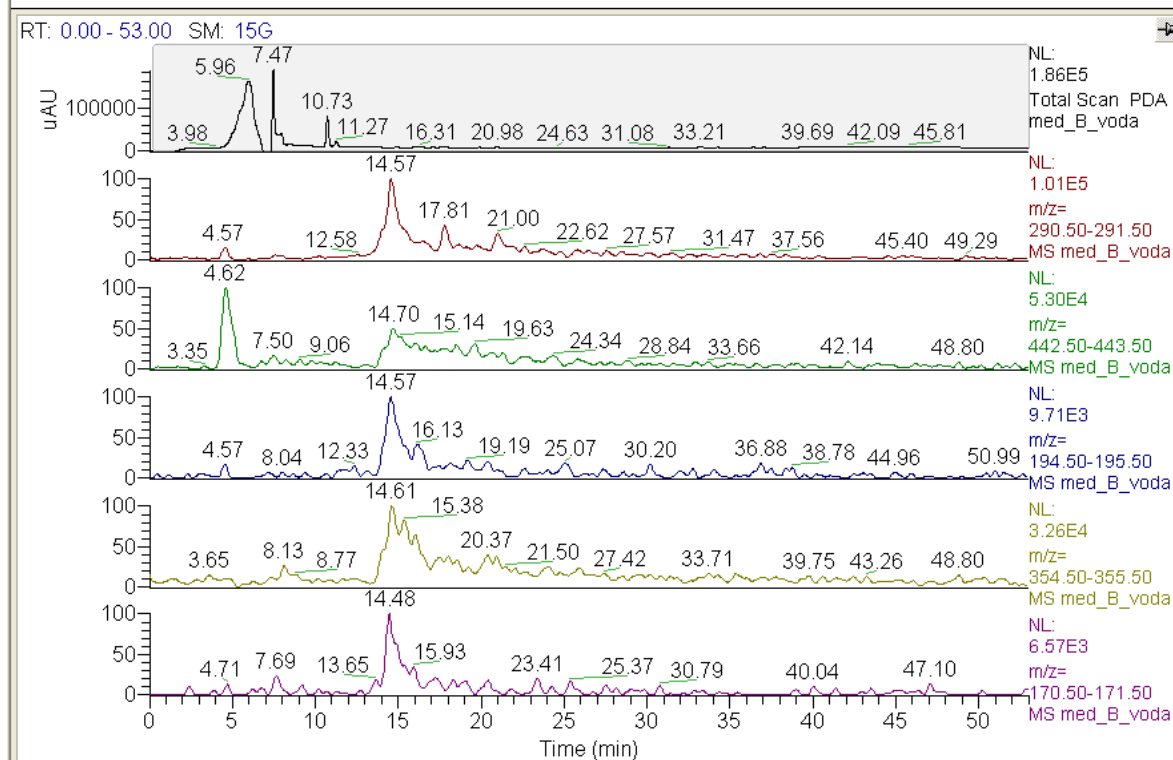
4/3/2009 2:07:53 PM



Příloha 16: Hmotnostní spektrum lipového medu (1) - extrakce vodou.

C:\Xcalibur\data\A\med_B_voda

4/3/2009 3:01:21 PM



Příloha 17: Hmotnostní spektrum řepkového medu natural (5) - extrakce ethyacetátem.

C:\Xcalibur\data\Aja\med_F_extr

4/3/2009 7:00:33 PM

